

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**AÇÃO HEPATOPROTETORA DO ANTIOXIDANTE
QUERCETINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE
ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA**

ÉDER MARCOLIN

Porto Alegre – RS, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**AÇÃO HEPATOPROTETORA DO ANTIOXIDANTE
QUERCETINA NO MODELO EXPERIMENTAL DE
ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA**

Éder Marcolin

Orientadora: Prof^a. Dra. Norma Possa Marroni

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. María Jesús Tuñon

*Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.*

Porto Alegre – RS, 2012.

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A. J. Cronin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a cada pessoa, que menos que imagine, foi importante para realização desse projeto, seja pelo empenho em auxiliar-me em cada fase do experimento ou pelo simples fato de deixar uma palavra amiga de apoio e incentivo.

Agradeço a minha família que soube dar-me a liberdade de poder ir e vir quando necessário, soube entender minha tão frequente ausência, soube respeitar meus momentos de dificuldade e, sobre tudo, soube dar o amor incondicional que sempre recebi.

Agradeço às poucas pessoas que chamo de amigos que estiveram ao meu lado, mesmo à distância, sendo parte do que sou e dividindo comigo as conquistas.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia do HCPA, do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA e do Laboratório do grupo de Pesquisas da *Universidad de León* pela disponibilidade e auxílio neste grande projeto.

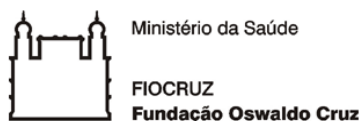
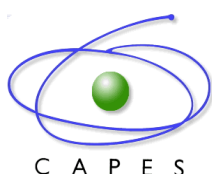
A Dra. Jaqueline Picada, obrigado por enriquecer de forma ímpar o meu trabalho, pelos seus conhecimentos e técnicas, pelo seu empenho e dedicação, pela sua colaboração e pela sua amizade.

Ao Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas que enriqueceu de maneira ímpar meu trabalho e nos recebeu de forma acolhedora em seu departamento.

A Dra. María Jesús Tuñon, minha co-orientadora, muito obrigado pela acolhida e por acreditar no meu projeto. Pela incansável busca de novidades e pelo ensino de novas técnicas e possibilidades.

A Dra. Norma Possa Marroni, minha orientadora, agradeço de forma especial pela presença constante em um longo período de minha caminhada. Agradeço pela confiança ao aceitar orientar um projeto onde tivemos de iniciar do zero e romper muitas barreiras para alcançarmos nossos objetivos. Obrigado por ser orientadora e por atuar em vários outros papéis na minha vida.

Agradeço de sobremaneira a Deus que sempre esteve a minha frente para me guiar, ao meu lado para me acompanhar, atrás de mim para me proteger e sobre mim para me abençoar.



Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia – Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e no Instituto de Biomedicina da *Univesidad de León* – Espanha. Foi subvencionado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e *Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas* (CIBERehd). Teve como colaboradores a Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) e a Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ).

PREMIAÇÕES

Este projeto de pesquisa recebeu os seguintes prêmios durante o seu desenvolvimento:

2010: Honra ao Mérito na FeSBE 2010, Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE

2010: PRÊMIO JORGE FINDOR - ALEH, XXI Congresso da Associação Latino-Americana para o Estudo do Fígado - ALEH

2009: Destaque na II Semana Científica da UFCSPA, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

2009: Destaque no IV Salão de Iniciação Científica, Centro Universitário Metodista IPA.

2009: Destaque no XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2009: Destaque na II Semana Científica da UFCSPA, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

2009: Menção honrosa - Destaque no II Encontro de Hepatologia Clínica e Experimental do HCPA, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

·ROO	Radical Peroxil
°C	Graus Celsius
AGL	Ácidos Graxos Livres
ALT	Alanina-Aminotrasferase
AREG	Anfiregulina
AST	Aspartato-Aminotrasferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CMCNa	Carboximetilcelulose Sódica
CO+Q	Controle + Quercetina
CO+V	Controle + Veículo
COX-2	Cicloxygenase 2
CTGF	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
Cu ²⁺	Íon Cobre
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
CuZnSOD	SOD Cobre e Zinco
dL	Decilitro
DHBA	Dihidroxi-Ácido-Benzóico
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNPH	Dinitrofenihidrazina
e ⁻	Elétron
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EAN	Espécies Ativas de Nitrogênio
EDTA	Ácido Etilendiamminotetraacetico
EHNA	Esteato-Hepatite Não Alcoólica
EHNA+Q	Esteato-Hepatite Não Alcoólica + Quercetina
EHNA+V	Esteato-Hepatite Não Alcoólica+ Veículo
FA	Fosfatase Alcalina
FD	Frequência de Dano
Fe ²⁺	Íon Ferro (reduzido)
FeSOD	SOD Ferro

G	Grama
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSH	Glutationa Oxidada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HClO ₄	Ácido Perclórico
HGMB1	Proteína de Alta Mobilidade do Grupo B1
ID	Índice de dano
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IRS-2	Receptor de substrado da insulina-2
JNK	Jun amino-terminal quinase
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LPO	Lipoperoxidação
M	Molar
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MCD	Deficiente de Metionina e Colina
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligrama
Min	Minuto
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
MMP-9	Metaloprotease de Matriz - 9
μmol	Micromol
MnSOD	SOD Manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Adenina Dinucleotideo
NADP	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato

NADPH	Fosfato Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
¹ O ₂	Oxigênio Singlet
O ₂ ^{·-}	Radical Ânion Superóxido
OH [·]	Radical Hidroxila
P	Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
pJNK	Jun amino-terminal quinase fosforilada
PKA	Proteína Quinase A
POD	Piruvato Oxidase
PPARP	Receptor-P de ativação de proliferação peroximal
PPARPα	Receptor de ativação de proliferação peroximal - α
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
®	Marca Registrada
RI	Resistência Insulínica
RL	Radical Livre
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROOH	Peróxido Orgânico
Rpm	Rotação Por Minuto
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>
SOCS-3	Supressor de sinalização de citocinas 3
SOD	Superóxido Dismutase
SREBP-1c	Proteína de Ligação Elemento de Resposta a Esterol-1c
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador - β
TLR-4	Receptor <i>Toll-like</i> - 4

TNF α	Fator de Necrose Tumoral alpha
U	Unidade
UV	Ultra-violeta
v/v	Volume Por Volume
VLDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
Zn ²⁺	Zinco
μ	Micra
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	7
RESUMO.....	13
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	20
1 REFERENCIAL TEÓRICO	24
1.1 Esteato-Hepatite Não Alcoólica.....	24
1.1.1 Definição	24
1.1.2 Epidemiologia da DHGNA e da EHNA.....	26
1.1.3 Quadro Clínico e Patogenia da EHNA	29
1.1.4 Diagnóstico da EHNA	33
1.1.5 Modelo Experimental de EHNA induzida por Dieta Deficiente de Metionina e Colina	36
1.2 Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	38
1.2.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio.....	38
1.2.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas e Não Enzimáticas	44
1.3 O Flavonóide Quercetina	48
1.4 Avaliação de Atividade Genotóxica	50
2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	54
2.1 Objetivo Geral	54
2.2 Objetivos Específicos.....	54
2.2.1 Experimento I	54
2.2.2 Experimento IIa	55
2.2.3 Experimento IIb	56
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 Experimento I	59
3.1.1 Delineamento da Pesquisa	59
3.1.2 Delineamento Experimental	59
3.1.2.1 Animais	59
3.1.2.2 Considerações Bioéticas.....	60
3.1.2.3 Modelo Experimental	61
3.1.2.4 Eutanásia dos animais.....	61
3.1.2.5 Análise Histopatológica	62
3.1.2.6 Análises Bioquímicas e de Integridade Hepática.....	63
3.1.2.7 Análises de Lipoperoxidação e das Enzimas Antioxidantes.....	64
3.1.2.8 Análises Estatísticas	67
3.2 Experimento IIa.....	67
3.2.1 Delineamento da Pesquisa	67
3.2.2 Delineamento Experimental	68
3.2.2.1 Animais	68
3.2.2.2 Considerações Bioéticas.....	68
3.2.2.3 Modelo Experimental	69
3.2.2.4 Eutanásia dos animais.....	70
3.2.2.5 Análise Histopatológica	70
3.2.2.6 Análises Bioquímicas e de Integridade Hepática.....	71

3.2.2.7 <i>Análises de Lipoperoxidação e das Enzimas Antioxidantes</i>	72
3.2.2.8 <i>Análises do Dano de DNA através do Ensaio Cometa</i>	74
3.2.2.9 <i>Análises Estatísticas</i>	75
3.3 Experimento IIb	76
3.3.1 Delineamento da Pesquisa	76
3.3.2 Delineamento Experimental	76
3.3.2.1 <i>Animais</i>	76
3.3.2.2 <i>Considerações Bioéticas</i>	77
3.3.2.3 <i>Modelo Experimental</i>	77
3.3.2.4 <i>Eutanásia dos animais</i>	78
3.3.2.5 <i>Análise Histopatológica</i>	79
3.3.2.6 <i>Análise Imuno-histoquímica</i>	79
3.3.2.7 <i>Análises Bioquímicas de Integridade Hepática</i>	80
3.3.2.8 <i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – PCR em tempo real</i>	81
3.3.2.9 <i>Análises por Western Blotting</i>	82
3.3.2.10 <i>Análise Estatística</i>	83
4 RESULTADOS	85
4.1 Experimento I	85
4.2 Experimento IIa	94
4.3 Experimento IIb	127
5 DISCUSSÃO	161
CONCLUSÃO	170
PERSPECTIVAS FUTURAS	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
ANEXOS	194



RESUMO

Introdução: A Esteato-Hepatite Não-Alcoólica (EHNA) é uma doença com alta incidência, difícil diagnóstico e tratamentos ainda não efetivos, o que impulsiona a utilização de modelos experimentais para indução da EHNA e o estudo das rotas de desenvolvimento desta doença, bem como tentativas de tratamento. **Objetivo:** Tem-se como objetivo desenvolver um modelo experimental de EHNA a partir do uso de uma dieta deficiente de metionina e colina (MCD) fabricada no Brasil, avaliar as alterações hepáticas, o estresse oxidativo, os danos ao DNA e os parâmetros moleculares de inflamação e fibrose decorrentes da doença, bem como avaliar a modulação resultante da suplementação do flavonóide antioxidante quercetina (Q). **Métodos:** Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 8 semanas. No primeiro experimento, que visou estabelecer o modelo experimental de EHNA, os animais foram divididos em dois grupos (n=15), onde um grupo foi alimentado com dieta MCD e o outro com dieta controle no período de duas semanas. No segundo experimento, utilizaram-se quatro grupos (n = 16): (i) controle + veículo (ração controle com carboximetilcelulose sódica a 1%, usada como veículo, CO + V), (ii) ração controle mais Q 50 mg / kg administrada intragastricamente (CO + Q), (iii) dieta MCD mais veículo (EHNA + V), e (iv) dieta MCD mais Q (EHNA + Q). As dietas foram administradas por 4 semanas e avaliou-se as alterações bioquímicas hepáticas, a repercussão histopatológica e imuno-histoquímica, a lipoperoxidação e as enzimas antioxidantes, os danos causados ao DNA por ensaio cometa, bem como, os parâmetros moleculares de inflamação e fibrose através da avaliação de mRNA de TNF- α , HMGB-1, COX-2, CTGF, TGF- β , MMP-9 e AREG por *RT-PCR*, e a expressão proteica de TLR-4, JNK e pJNK por *Western blotting*, avaliando-se o efeito da suplementação do flavonóide antioxidante Q. **Resultados:** Os camundongos que receberam a dieta MCD apresentaram perda de peso e aumento significativo das enzimas de integridade hepática e diminuição dos níveis bioquímicos sistêmicos de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL e VLDL. Todos os animais EHNA mostraram, pelo menos, algum grau de esteatose macrovesicular. O diagnóstico de EHNA foi realizado em 100% dos camundongos que receberam a dieta MCD e nenhum dos animais que recebeu dieta controle apresentou alterações histológicas. Os animais EHNA apresentaram aumento de lipoperoxidação e do antioxidante glutatona (GSH). O ensaio cometa revelou um aumento significativo nos danos de DNA no fígado do grupo EHNA + V em comparação com CO + V. O grupo EHNA + Q

mostrou danos ao DNA significativamente menores do que EHNA + V e uma significativa diminuição do processo inflamatório através da avaliação da expressão de: TNF- α , HMGB1, TLR-4, a COX-2 e JNK e na fibrose pela expressão de CTGF, TGF- β , MMP-9 e AREG no fígado. **Conclusão:** A dieta deficiente de metionina e colina induziu no fígado de camundongos C57BL/6 características histopatológicas semelhantes à esteatose e à esteato-hepatite de humanos. A suplementação com o flavonoide antioxidante quercetina (50 mg / kg) reduziu os níveis de lipoperoxidação, os danos ao DNA no fígado, os níveis enzimáticos hepáticos, bem como os níveis dos parâmetros moleculares inflamatórios e de fibrose estudados, sugerindo proteção hepática neste modelo.



ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic steatohepatitis is a disease with a high incidence, difficult diagnosis, and yet no effective treatment. These reasons lead to the use of experimental models for induction of NASH, and the study of routes developing this disease, as well as attempts to an effective therapy. **Aims:** This study was designed to develop an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis based on a methionine- and choline-deficient diet which is manufactured in Brazil. Furthermore, evaluate the liver alterations, oxidative stress parameters, lipoperoxidation, DNA damage, and the molecular parameters of inflammatory and fibrosis, as well as the response to the antioxidant flavonoid quercetin (Q). **Methods:** Male C57BL/6 mice were used with 8 weeks of age. In the first experiment, which aimed to establish an experimental model of NASH, the animals were divided into two groups (n = 15), the experimental group fed with a methionine- and choline-deficient diet manufactured by Brazilian company PragSoluções[®], and the control group fed with a normal diet, for a period of 2 weeks. In the second experiment, we used four groups (n = 16): (i) Control plus Vehicle (control ration plus carboxymethylcellulose 1% used as vehicle, CO + V); (ii) Control ration plus Q 50 mg/kg (CO + Q); (iii) MCD diet plus vehicle (NASH + V); and (iv) MCD diet plus Q (NASH + Q). Diets were administered for 4 weeks, which aimed to evaluate the hepatic biochemical changes, the histopathological impact and immunohistochemical analysis, lipid peroxidation and antioxidant enzymes, the damage caused to DNA, and the molecular parameters of inflammation and fibrosis by assessment of mRNA of TNF- α , HMGB-1, COX-2, CTGF, TGF- β , MMP-9 and AREG by RT-PCR Protein expression and TLR-4, pJNK and JNK by Western blotting to assess the effects of supplementation of the antioxidant flavonoid Q. **Results:** The mice that received the methionine- and choline-deficient diet showed weight loss and significant increase in hepatic damage enzymes, as well as a decrease on systemic levels of glycemia, triglycerides, total cholesterol, HDL and VLDL. The diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis was performed in 100% of the mice that were fed the methionine- and choline-deficient diet. All non-alcoholic steatohepatitis animals showed some degree of macrovesicular steatosis, ballooning, and inflammatory process. None of the animals which were fed with the control diet presented histological alterations. All non-alcoholic steatohepatitis animals showed significantly increased lipoperoxidation and antioxidant GSH activity. The comet assay revealed a significant increase in DNA damage in the NASH + V

group, in comparison to CO + V. The NASH + Q group showed significantly lower DNA damage than NASH + V. The NASH+Q group showed a significant reduction of inflammation based on the expression of TNF- α , HMGB1, TLR-4, COX-2 and JNK and a reduction in fibrosis based on the expression of CTGF, TGF- β , MMP-9 and AREG in the liver. **Conclusion:** The low cost and easily accessible methionine- and choline-deficient diet explored in this study is highly effective in inducing steatosis and steatohepatitis in animal model, leading to alterations that are similar to those observed in human livers. The results demonstrate that an antioxidant supplementation of Q 50 mg / kg reduced the levels of lipid peroxidation, DNA damage, liver enzymes, as well as the levels of inflammation and fibrosis in the liver, suggesting protective effects of the liver in this model.



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O termo Esteato-Hepatite Não Alcoólica (EHNA ou como mais comumente denominada *Non-alcoholic steatohepatitis* – NASH) foi introduzido em 1980 por Ludwig¹ para definir uma doença caracterizada por mudanças histológicas similares às encontradas na hepatite alcoólica, mas em pacientes com consumo de álcool nulo ou não significativo.

Atualmente, esse termo está englobado dentro de uma entidade mais ampla, a doença hepática gordurosa não alcoólica - DHGNA, ou *Non-alcoholic Liver Disease* – NAFLD, que inclui vários estágios evolutivos desde a esteatose hepática simples, a EHNA propriamente dita, a cirrose hepática e, finalmente, evoluindo para um hepatocarcinoma².

A DHGNA pode aparecer no contexto de múltiplas afecções, entre as quais o uso de fármacos, a cirurgia derivativa da obesidade mórbida e enfermidades pouco frequentes como a doença de Weber-Christian ou a abetalipoproteinemia. Porém, a principal associação etiológica da DHGNA é com a síndrome da resistência insulínica (RI), considerada o componente hepático da síndrome metabólica que, em sua expressão fenotípica completa, estaria caracterizada pela presença de RI, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial sistêmica³.

A prevalência da DHGNA, que na EHNA apresenta sua expressão mais significativa, é desconhecida, incrementada de forma notável nos últimos anos e afetando cerca de um terço da população adulta nos países desenvolvidos. A prevalência estimada oscila entre 3 a 46% da população analisada, sendo esta variabilidade extraordinária dependente dos métodos diagnósticos (bioquímicos, de imagem ou histológicos) e da população objeto de estudo^{2, 4, 5}.

O reconhecimento do seu potencial evolutivo e a sua alta prevalência na população mundial são os principais motivos que despertaram o interesse da comunidade científica para realizar estudos relacionados com essa doença⁶. No que se refere ao tratamento, até o momento, nenhuma terapia específica mostrou resultados conclusivos e muitos autores acreditam que os pacientes que apresentam esteatose devem ser apenas observados e avaliados periodicamente. Outros sugerem que a redução gradual de peso em pacientes obesos e a realização regular de atividade física aeróbica trariam benefícios, porém são necessários estudos que confirmem estas hipóteses⁷⁻⁹.

Estudos utilizando a terapia medicamentosa efetiva para o tratamento de EHNA em seres humanos não são conclusivos e a grande dificuldade é a necessidade da realização de uma segunda biópsia hepática para avaliar a evolução do tratamento⁷, responsável pela baixa realização deste tipo de estudo, já que esta é o padrão áureo para testar a eficácia terapêutica.

Neste sentido, o desenvolvimento de modelos experimentais que caracterizem a fisiopatologia da EHNA, suas complicações e a utilização de uma terapêutica adequada, pode auxiliar no entendimento e na explicação da doença. Nos estudos experimentais podem-se controlar a heterogeneidade genética, as diferenças entre os gêneros, os fatores ambientais e o modo de vida, já que todos os animais utilizados nos estudos passam por situações semelhantes¹⁰.

Um determinante para a eficácia da utilização de estudos experimentais nesta doença são os custos operacionais utilizados em cada investigação e o tempo de indução da doença. A escolha de um modelo experimental efetivo e condizente com a necessidade de desenvolver a EHNA pode esclarecer o real efeito da terapia medicamentosa bem como o acompanhamento natural da doença¹¹.

O emprego de uma dieta deficiente em aminoácidos essenciais, como a metionina e a colina, para indução de esteato-hepatite não alcoólica, é um modelo bem aceito¹². Porém, os custos e trâmites necessários para a importação desta ração dificultam sua utilização em países em desenvolvimento, como o Brasil.

Na EHNA, o fígado, sob condições de estresse oxidativo derivado de sobrecarga de ácidos graxos, apresenta uma β -oxidação peroxisomal ativada, gerando peróxido de hidrogênio¹²⁻¹⁴. Esta etapa da patogênese da EHNA pode ser controlada pela oferta exógena de antioxidantes, mas requer um estudo mais aprofundado.

A quercetina (Q), um flavonóide aglicona muito encontrado na natureza, presente em grandes quantidades em vegetais, frutas, chá e vinho tinto, representa um dos antioxidantes de origem vegetal com o mais alto potencial, protegendo as células contra espécies ativas de oxigênio (ERO)¹⁵ e com provável potencial terapêutico contra muitas doenças, incluindo enfermidades hepáticas, renais, isquêmicas do coração, aterosclerose e câncer¹⁶⁻²⁰.

Este estudo teve como objetivo desenvolver um modelo experimental de EHNA a partir do uso de uma dieta deficiente de metionina e colina desenvolvida e fabricada no Brasil, procurando-se avaliar as alterações hepáticas decorrentes da doença e os efeitos da suplementação do antioxidante quercetina na evolução da enfermidade.

Esta tese está redigida conforme a normativa estabelecida pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresentando um abrangente referencial teórico, os experimentos realizados e seus resultados discutidos (na forma de artigos científicos), seguido de uma discussão, conclusão e perspectivas futuras. Destacam-se dois experimentos, compreendidos em três artigos científicos, os quais norteiam a pesquisa experimental. O primeiro artigo (Experimento I) aborda o desenvolvimento, padronização e validação do modelo experimental de EHNA através de uma dieta deficiente de metionina e colina (MCD). O segundo (Experimento IIa) se atém aos efeitos da suplementação do antioxidante quercetina sobre o eixo de estresse oxidativo e os danos ao DNA, enquanto o terceiro (Experimento IIb) apresenta os efeitos gerados a nível molecular nos parâmetros de inflamação e fibrose, bem como a ação da suplementação do antioxidante empregado, a quercetina.



REFERENCIAL
TEÓRICO

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Esteato-Hepatite Não Alcoólica

1.1.1 Definição

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é considerada, atualmente, a forma mais comum de doença hepática no mundo ocidental, relacionada principalmente ao aumento da prevalência da obesidade⁶. A DHGNA abrange um amplo espectro de doenças, desde casos de esteatose simples até Esteato-Hepatite Não Alcoólica (ENHA ou NASH – *Nonalcoholic Steatohepatitis*) e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular²¹. Pode ser vista como exemplo de mudanças no perfil da sociedade, aliadas a certas prerrogativas genéticas que modulam o surgimento de entidades mórbidas de repercussão mundial²².

A EHNA por ter sido descrita inicialmente em mulheres, obesas e/ou diabéticas, sem história significativa de ingestão alcoólica, recebeu várias denominações: hepatite gordurosa, hepatite pseudo-alcoólica e, finalmente, EHNA (NASH) por Ludwig e colaboradores, em 1980²³. É uma condição metabólica caracterizada por acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, infiltrado inflamatório e fibrose, com aspecto morfológico indiferenciável da doença hepática alcoólica, em indivíduos não etilistas¹. Sua prevalência parece se ampliar em praticamente todas as regiões do mundo, incluindo a população pediátrica. Pode até mesmo constituir em alguns países, a principal causa de morte por doença do fígado e de indicação de transplantes hepáticos^{22, 24, 25}.

DHGNA compreende um espectro de entidades clinicopatológicas que têm como denominador comum a esteatose hepática. Enquanto a esteatose simples apresenta um curso

habitualmente benigno, a EHNA pode progredir para fibrose hepática, cirrose e até mesmo carcinoma hepatocelular²². Atualmente, o exame histopatológico de tecido hepático, obtido por biópsia, constitui o único método que permite diferenciar esteatose hepática simples de EHNA, o que limita os estudos epidemiológicos, uma vez que tal procedimento não pode ser realizado com finalidades exclusivas de estudo, por razões éticas²⁶. Diante desta limitação, a dosagem sérica dos marcadores de lesão e de função hepática, os métodos de imagem e a história clínica são utilizados para o diagnóstico, mesmo não possuindo total fidedignidade.

Os primeiros relatos de EHNA datam de cinco décadas, quando Leevy (1962)²⁷ estudou a associação entre a esteatose hepática, com ou sem necrose, em não alcoolistas, obesos ou diabéticos. Padrões histopatológicos similares também foram descritos na lipodistrofia, abetalipoproteinemia, perda de peso acelerada por jejum em obesos e doença de Weber-Christian.

Cirurgias de *bypass* jejunoileal e gastroplastias realizadas para tratamento da obesidade mórbida, perda de peso acelerada por jejum em obesos, uso de nutrição parenteral recente, derivação biliopancreática, ressecção extensa de intestino delgado, diverticulose jejunal com supercrescimento bacteriano, também foram descritas em associação com essa hepatopatia²⁸. Drogas como maleato de perexilena, glicocorticóides, hormônios estrógenos sintéticos, tamoxifeno, amiodarona e, mais recentemente, substâncias químicas por via inalatória, como as quais estão expostos profissionais da indústria petroquímica, também foram imputados na gênese da EHNA^{23, 28}.

Entretanto, por longo tempo, houve resistência em reconhecer as etiologias propostas, e muitos pacientes foram taxados de alcoolistas não confessos. Somente após os estudos de Ludwig *et al.* em 1980, a EHNA foi definida como entidade clínico-histopatológica²⁸. Sua série, constituída de vinte indivíduos sem antecedentes de consumo de álcool significativo, era predominantemente feminina, obesa e, com elevada frequência, diabética. O padrão histopatológico era similar ao da hepatopatia alcoólica, inclusive com corpúsculos hialinos de Mallory²⁷.

Autores como Itoh *et al.* (1982)²⁹, Diehl *et al.* (1988)³⁰, Powell *et al.* (1990)²¹ e Pinto *et al.* (1996)³¹ sucederam-se reafirmando, através de suas casuísticas, a EHNA como uma afecção benigna, de mínima progressão, do sexo feminino na sua quinta ou sexta década de vida, associada à obesidade, diabetes e hiperglicemia. Contudo, em 1994, Bacon *et al.*³²

publicaram sua série, na qual sexo masculino, não obesos, não diabéticos com elevados níveis séricos de saturação de transferrina e de ferritina, eram características predominantes. Esse estudo provocou impacto na literatura por expandir o espectro de indivíduos acometidos e destacar o potencial cirrotizante²⁸.

Atualmente, a EHNA é a mais importante forma epidemiológica e clínica de DHGNA e que pode se associar à fibrose e evoluir para cirrose. Considerada uma das mais frequentes doenças do fígado no mundo, ocorre em ambos os gêneros, em qualquer faixa etária, incluindo crianças e adolescentes²³.

1.1.2 Epidemiologia da DHGNA e da EHNA

Durante muito tempo, o abuso de álcool e as hepatites virais crônicas foram as principais causas de morbidade e mortalidade por doença hepática no mundo. Entretanto, nas últimas décadas, em decorrência do aumento drástico da prevalência de obesidade, a DHGNA tem sido reconhecida como a forma mais comum de doença hepática crônica em diversas partes do mundo, particularmente nos países industrializados^{24-26, 33}, motivo pelo qual já é considerada um problema de saúde pública²².

O interesse pela história natural, pela patogênese e pelo tratamento da EHNA tem aumentado nos últimos anos. No banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - PubMed), são encontradas 1352 referências publicadas nos últimos 2 anos³⁴, denotando o crescente interesse e reconhecimento da importância do estudo desta doença.

Apesar de frequente, a real prevalência de EHNA na população geral não está plenamente estabelecida. A maioria dos estudos epidemiológicos sobre DHGNA e EHNA são retrospectivos e incluem grupos especiais de pacientes com fatores de risco para a enfermidade. No entanto, mesmo que ínfimas, nos últimos anos, têm sido publicadas investigações prospectivas que abrangem a população geral, o que tem proporcionado mais conhecimento sobre os aspectos epidemiológicos dessa doença hepática em todo o seu espectro, mesmo com muitas limitações²².

As diferenças étnicas entre os grupos estudados dificultam a extrapolação dos achados de uma para outra população, o que limita a fidedignidade e estimula estudos prospectivos⁶.

Mesmo com escassos dados sobre a incidência de EHNA, é cada vez mais comum os clínicos atenderem pacientes assintomáticos com enzimas hepáticas elevadas, detectadas em exames de triagem. Nos Estados Unidos, pesquisas em ambulatorios de hepatologia, apresentam a EHNA como o terceiro diagnóstico mais frequente, superada apenas por hepatopatia alcoólica e hepatite crônica pelo vírus C³⁵.

Estudo de coorte, em andamento há mais de 10 anos, que inclui indivíduos de 12 a 65 anos de idade, aparentemente saudáveis e residentes em duas cidades do norte da Itália, sugere incidência de dois casos novos de DHGNA por 100 habitantes-ano, empregando-se ultrassonografia como método diagnóstico³³.

Em estudo realizado no Japão observou-se a incidência anual de aproximadamente 10%³ e de 31 casos por 1000 pessoas-ano³⁶. Em São Paulo, 10 dos 40 candidatos a doador de sangue da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro Paulista com elevação crônica da alanina aminotransferase sérica, submetidos à biópsia hepática, receberam o diagnóstico de EHNA, perfazendo 25% dos casos^{37, 38}.

A prevalência de EHNA é estimada em torno de 1,2 a 4,8% da população geral, contudo, essa frequência aumenta consideravelmente em portadores de obesidade, sobrepeso³⁹ e síndrome metabólica³⁸. Estima-se que a EHNA ocorra em 20% dos casos em uma população de indivíduos obesos. Estudo de necropsias mostrou EHNA em 18% dos pacientes com peso corporal acima de 40% do ideal, e em 2,7% daqueles sem sobrepeso⁴⁰.

Estudo epidemiológico de grande impacto sobre essa doença, conclui que as estimativas mais prováveis de prevalência de DHGNA e EHNA na população geral sejam, aproximadamente, 20 e 23%, respectivamente, o que demonstra que este espectro de enfermidade tem se revelado como a doença hepática crônica mais comum nos países industrializados³³.

A DHGNA ocorre em indivíduos de todas as idades, e o aumento de sua prevalência na população em geral atinge todas as faixas etárias. Entretanto, é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade²⁵.

Em estudo brasileiro prospectivo, multicêntrico, publicado em 2011, que envolveu 1280 pacientes com DHGNA assistidos em 16 centros médicos localizados nas cinco diferentes regiões geográficas do país, observou-se ligeira prevalência da doença no gênero masculino (53%) e média de idade de 50 anos⁴¹. Esses dados seguem as conclusões de estudos recentes que demonstram prevalência ligeiramente superior da entidade no gênero masculino. Entre os pacientes que realizaram biópsia hepática, a EHNA foi um diagnóstico frequente, cirrose foi observada em 15,4% e o carcinoma hepatocelular em 0,7% dos casos⁴¹.

No que se refere a fatores de risco, os medicamentos, a exposição a solventes tóxicos, a perda rápida de peso, a nutrição parenteral total e as doenças metabólicas (como lipodistrofia e disbetalipoproteinemia), dentre outros agentes, são indicados como precursores da esteatose hepática e são, em geral, descritos como causadores de DHGNA secundária^{42, 43}. Já a DHGNA primária encontra-se associada à resistência insulínica e é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica^{22, 43}.

Sobre a morbimortalidade associada à enfermidade, diferentes estudos demonstram que a maioria dos pacientes com esteatose hepática simples apresentam prognóstico favorável e que sua mortalidade não difere significativamente daquela da população geral, embora possa ocorrer, em alguns casos, progressão para fibrose e cirrose hepática^{44, 45}, em contraste com a EHNA que tende a progredir para fibrose e cirrose hepática^{46, 47}. Indivíduos selecionados da população geral norte-americana com DHGNA apresentaram maior taxa de mortalidade, tanto global como por doença hepática, demonstrado por um estudo de coorte com seguimento de oito anos e meio, sendo a hepatopatia crônica a terceira causa de morte, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares e neoplásicas⁴³.

Segundo Galizzi *et al.*²², os conhecimentos sobre história natural da DHGNA e EHNA são baseados em estudos de populações investigadas há 2 ou 3 décadas, tendo havido marcantes mudanças na epidemiologia da doença nos últimos 15 anos, com aumento da prevalência de obesidade inclusive em crianças e em populações nas quais o excesso de peso não é tradicionalmente considerado importante, como as asiáticas. Assim, questiona-se sobre quais serão os perfis de morbidade e mortalidade por essas enfermidades hepáticas nas próximas décadas, principalmente em relação aos riscos relativos de morte por cirrose hepática e por doenças cardiovasculares, certamente em ascensão.

1.1.3 Quadro Clínico e Patogenia da EHNA

O espectro evolutivo da DHGNA engloba esteatose hepática, esteato-hepatite, esteatofibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular^{44,48}.

A imensa maioria dos pacientes com DHGNA, bem como com EHNA, é assintomática, porém com presença de aumento de enzimas hepáticas ou a presença de fígado hiperecogênico na ultrassonografia⁴⁹. Cerca de 90% dos pacientes com essa enfermidade apresentam pelo menos uma manifestação da síndrome metabólica, sendo que aproximadamente 1/3 deles apresenta a síndrome completa que é definida com pelo menos 3 das seguintes características: obesidade central, hipertrigliceridemia, colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) baixo, hipertensão arterial e glicemia acima de 110 mg/dl⁵⁰.

A história clínica do paciente é pobre, visto que tal entidade clínica é assintomática, porém, fadiga e dor em peso no hipocôndrio direito são eventualmente relatadas. A doença pode estar presente em qualquer idade, mesmo em crianças e em ambos os sexos. Frequentemente, é diagnosticada na quarta e na quinta décadas de vida^{49, 50}. Em raros casos de doença avançada, em que já se tem evolução para cirrose, encontram-se achados clínicos de insuficiência hepática e hipertensão portal, como edema de membros inferiores, aumento do volume abdominal por ascite, icterícia ou colúria, e manifestações clínicas de encefalopatia hepática²².

A história natural da DHGNA depende principalmente dos aspectos histológicos na ocasião da biópsia hepática. Pacientes com esteatose pura ou com inflamação lobular têm um bom prognóstico, pois o risco de desenvolver cirrose em 10 a 20 anos é de 1 a 2%. Já os pacientes com esteato-hepatite têm uma chance de evoluírem para cirrose de 10 a 15% em 10 anos. Os pacientes que desenvolveram cirrose apresentam risco elevado de morte por problemas relacionados à hepatopatia crônica (incluindo o hepatocarcinoma)⁵¹.

A patogênese da DHGNA ainda não está totalmente elucidada, entretanto, diversos estudos têm demonstrado que esta doença espectral é multifatorial. Diversos fatores ou condições têm sido relacionados à predisposição da DHGNA. Dentre eles destacam-se a obesidade, a síndrome metabólica, diabetes, dietas hipercalóricas, o sedentarismo, a presença

de mutações e polimorfismos nos genes relacionados à resistência insulínica, hipertensão arterial, anormalidades no metabolismo lipídico e nos adipócitos⁵².

Embora se conheçam os fatores predisponentes e se saiba que a esteatose pode evoluir para cronicidade, a verdadeira relação causal entre a esteatose ou a EHNA, fibrogênese e a doença crônica do fígado, assim como sua patogênese, ainda não estão totalmente esclarecidas. A teoria mais aceita atualmente foi proposta por Day e James (1998)^{53, 54} e se refere à teoria dos dois “hits”. Segundo estes autores, a resistência insulínica seria a condição inicial ou primeiro estímulo (“first hit”)⁵⁵. O processo de formação da EHNA ocorre em duas etapas fundamentais: a deposição lipídica e a reação necroinflamatória⁵⁶. A etapa inicial, segundo a teoria dos “hits” seria o acúmulo de ácidos graxos no hepatócito, suplantando sua capacidade de metabolização e exportação consequente à ação lipogênica da insulina (Figura 1). A hiperinsulinemia presente na obesidade e síndrome metabólica favoreceria a lipogênese hepática e aumentaria a lipólise periférica, aumentando excessivamente a quantidade de ácidos graxos para o fígado, condições estas favoráveis para a infiltração gordurosa hepática⁵⁷.

O tecido adiposo libera a gordura na forma de ácidos graxos livres (AGL) mediante o estímulo da adrenalina, corticoesteróide e outros hormônios. Os AGL têm dois destinos após entrada nos hepatócitos: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP) ou são convertidos novamente em triglicerídeos, acoplados às lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) e exportados do fígado para o tecido adiposo. A deposição de triglicerídeos no interior do hepatócito (esteatose) decorre principalmente da disponibilidade e mobilização de AGL, da síntese hepática aumentada de AGL e do decréscimo da exportação hepática de triglicerídeos sob a forma de VLDL⁵⁸. Provavelmente, na DHGNA exista uma combinação destes fatores intensificados por alterações na lipólise pós-prandial relacionada à insulina, a qual provoca aumento de ácidos graxos liberados para o fígado: excesso de carboidratos na dieta que resulta em nova síntese de ácidos graxos hepáticos; falha na β -oxidação mitocondrial e depleção de adenosina trifosfato; produção de citocinas pró-inflamatórias e um complexo mecanismo deficiente de transporte de triglicerídeos⁵⁹.

Na DHGNA, a oxidação de ácidos graxos (AG) mitocondriais e a exportação de VLDL não são compatíveis com o aumento da síntese desse AG, levando a esteatose. Em indivíduos saudáveis, a oxidação mitocondrial é o mecanismo dominante de disposição de AG

sobre condições fisiológicas normais, porém, é uma grande fonte de espécies ativas de oxigênio²².

Os ácidos graxos livres no fígado são normalmente metabolizados pela β -oxidação mitocondrial, principal etapa do catabolismo dos ácidos graxos que ocorre na mitocôndria (um transportador especializado – carnitina - carrega o ácido graxo do citosol para a matriz mitocondrial, onde fragmentos de 2 carbonos são removidos do terminal carboxila da acil-CoA, produzindo acetil-CoA, NADH e FADH₂), todavia, sob condições de desequilíbrio, a β -oxidação peroxissomal é ativada, gerando peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estes, por sua vez, podem levar a formação do radical hidroxil (OH[•]), altamente reativo, levando ao estresse oxidativo e conseqüentemente à inflamação e fibrose⁶⁰. O acúmulo de ácidos graxos livres, as drogas inibidoras da cadeia respiratória ou a sobrecarga de ferro são causas de estresse oxidativo⁶¹.

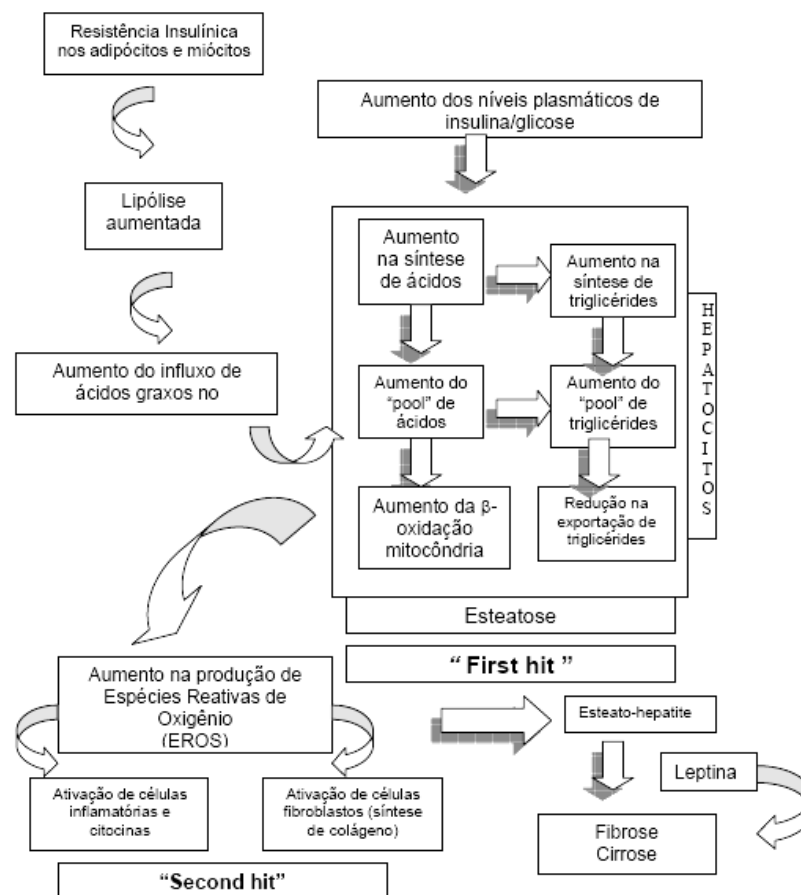


Figura 1: Fisiopatogênese da EHNA⁵⁵

Neste contexto, o estresse oxidativo, considerado como o “second hit”, seria importante na evolução da esteatose para esteato-hepatite e fibrose⁶². Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e, nesse processo, os produtos intermediários são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o H_2O_2 e o radical hidroxil, denominados conjuntamente Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). O excessivo aporte de ácidos graxos ao fígado pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de ERO, bem como ativação de outras vias de oxidação lipídica (via peroxissomal e microssomal) que geram, por sua vez, mais ERO, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as células estreladas, favorecendo a fibrogênese⁶³.

Diversas outras teorias já foram lançadas como tentativas de elucidação da patogenia da EHNA como a teoria dos múltiplos-*Hits*⁶⁴, a teoria do *Hit* único⁶⁵, entre outras. Entretanto, a teoria de Day e James (1998) ainda continua sendo a mais aceita.

Um dos produtos finais da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA) que ativa a produção de colágeno com consequente fibrose. O processo inflamatório também pode ser desencadeado pelo MDA que ativa citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-8 e interleucina-6⁶³.

Estudos sugerem que a função mitocondrial está diminuída na EHNA devido a alterações ultraestruturais que resultam em uma oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória, gerando ERO que podem atacar ácidos graxos polinsaturados e iniciar a lipoperoxidação²².

Apesar da superabundância de substratos de alta energia, o fígado gorduroso associa-se, paradoxalmente, com um teor reduzido de ATP (adenosina trifosfato)⁶⁶. As mitocôndrias parecem ser um alvo de radicais livres pró-oxidantes (superóxido e radicais hidroxílicos), cujos efeitos dão as características distintas fundamentais da EHNA⁶⁷. Mudanças morfológicas mitocondriais como inchaço e cristais intramitocondriais aparecem rapidamente na EHNA humana. Atualmente, estudos sobre o estresse de retículo endoplasmático estão sendo iniciados para verificar como se desenvolve o eixo deste fenômeno e sua contribuição nessa enfermidade.

A disfunção mitocondrial também contribui para a ativação de vias apoptóticas por meio do citocromo c, que ativa as caspases pró-apoptóticas. Acredita-se que a toxicidade dos

ácidos graxos seja a força principal que leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa⁶⁸.

Outro estímulo importante, além do estresse oxidativo na progressão para inflamação e fibrose na DHGNA, seria a endotoxemia crônica presente principalmente na obesidade. A obesidade e a síndrome metabólica são condições inflamatórias que conduzem à aterosclerose e a um processo inflamatório crônico⁶⁹. O tecido adiposo secreta citocinas que atuam em mecanismos responsáveis pela sensibilidade à insulina. O TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) é uma citocina pró-inflamatória, que além de participar da resposta imunológica e da etiopatogenia de algumas neoplasias, também está envolvido na gênese da resistência insulínica, por inibir a fosforilação de receptores de insulina. O TNF- α é expresso pelo tecido adiposo e está envolvido em todas as fases de lesão hepática na DHGNA, promovendo a esteatose, estimulando a lipogênese nos hepatócitos e aumentando a liberação de AGL pelos adipócitos. Além disso, induz diretamente a apoptose dos hepatócitos e participa do processo de ativação de células estreladas, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose hepática⁷⁰.

Entretanto, os motivos pelos quais muitos pacientes com esteatose hepática, expostos aos mesmos fatores de estresse oxidativo, que jamais desenvolvem esteato-hepatite é uma questão ainda por esclarecer.

1.1.4 Diagnóstico da EHNA

A biópsia parece ser fundamental no diagnóstico de pacientes com EHNA, segundo parecer unânime entre os especialistas reunidos em 1998, no Simpósio de Consenso do *US National Institute of Health*²⁸, que a consideram como padrão-áureo de diagnóstico. Existem poucos exames de imagem capazes de detectar fibrose ou inflamação hepática com fidedignidade e a diferença entre os prognósticos da esteatose simples à EHNA avançada⁷².

O aspecto morfológico da EHNA é indiferenciável da esteato-hepatite alcoólica: esteatose, infiltrado inflamatório e fibrose. Cistos lipídicos, corpúsculo de Mallory-Denk, células claras, vacuolização nuclear, focos de necrose, metaplasia ductal e hemossiderina

hepatocelular também podem estar presentes. A esteatose predominante é macrovesicular, com células inflamatórias polimorfonucleares em região perivenular e discreto infiltrado linfomononuclear portal. A fibrose apresenta gradiente de quantidade de colágeno maior junto à vênula hepática terminal, reduzindo-se em direção ao espaço-porta⁷³.

Critérios padronizados para a avaliação de EHNA não são universais, tornando a análise dos dados de diferentes estudos um problema. A microscopia eletrônica mostra alterações mitocondriais, com presença de mitocôndrias gigantes que formam inclusões intracitoplasmáticas globulares e, também, colageneização do espaço de Disse com número e a porosidade do revestimento sinusoidal reduzidos. Essas alterações interferem na troca de substâncias entre o plasma e a membrana celular do hepatócito, e contribuem para a hipertensão portal⁴⁰.

Segundo Freitas (2006)²³ a presença de esteatose hepatocelular macrovacuolar, localizada principalmente na zona 3 (centrolobular) dos ácinos hepáticos, é um dos achados mais característicos da doença esteatótica hepática e traduz alterações no metabolismo dos lipídios, relacionado com maior aporte a partir de depósitos periféricos, síntese aumentada, dificuldade de exportação e/ou oxidação, sendo o fator definidor de DHGNA. A presença de esteatose microvacuolar, definida como presença intracitoplasmática de uma ou mais gotículas de gordura que não deslocam o núcleo de sua posição central no hepatócito, está relacionada com defeito na betaoxidação mitocondrial de ácidos graxos e reflete alteração mais grave do metabolismo celular⁷⁴.

A balonização hepatocelular reflete alterações da permeabilidade da membrana decorrente da ação de radicais livres e sua presença é fundamental para o diagnóstico de esteato-hepatite e relaciona-se ao risco de progressão da fibrose. Apresentam-se como hepatócitos maiores que os demais, assumindo forma globosa (balão) com citoplasma amplo, empalidecido pela diluição de suas organelas, filamentos e demais estruturas em quantidade maior de líquido⁷⁴.

As células balonizadas podem apresentar alterações na organização do citoesqueleto, formando corpúsculos de Mallory-Denk. Correspondem a inclusões citoplasmáticas hialinas, apresentando-se como grânulos, cordões ou agregados fortemente eosinofílicos. Não são fundamentais para o diagnóstico. São compostos principalmente por queratina 8 e 18 modificadas, hiperfosforiladas, com alterações em sua cadeia beta, além de ubiquitina e

proteína p62, sendo outros componentes cada vez mais identificados, proteínas de degradação celular e eventuais proteínas inespecificamente incorporadas aos agregados⁷⁵.

Hepatócitos necróticos e em apoptose podem ser observados e frequentemente se associam à infiltração inflamatória mista, de células mononucleares e granulocíticas no parênquima²³. O mecanismo de necrose lítica, com ruptura de membranas de grupos de hepatócitos vizinhos, extravasamento do seu conteúdo e atração de infiltrado inflamatório misto, com polimorfonucleares, além dos linfócitos e macrófagos, é a forma predominante de morte celular em esteato-hepatite, especialmente quando o grau de balonização atinge pontos incompatíveis com a vida destas células⁷⁶.

A fibrose da EHNA no adulto ocorre inicialmente nos espaços perissinusoidais nas zonas 3 dos ácinos (centro-lobular). Decorre da ativação de células estreladas hepáticas. A formação de septos entre as veias centrais e com espaço-porta prenuncia a evolução para cirrose^{1, 47}.

O Comitê Norte-Americano de Patologia para o Estudo da EHNA, através de seu grupo de hepatopatologia, recomenda que a seguinte classificação e critérios sejam adotados no diagnóstico e classificação da EHNA:

Tabela 1. Classificação da EHNA segundo a *Pathology Committee of NASH Clinical Research Network* (Kleiner et al., 2005)¹⁶⁴:

<i>Item</i>	<i>Definition</i>	<i>Score/Code</i>
Steatosis	<5%	0
	5% - 33%	1
	>33% - 66%	2
	>66%	3
Microvesicular Steatosis	Not Present	0
	Present	1
Inflammation	None	0
	<2 foci per 200x field	1
	2-4 foci per 200x field	2
	>4 foci per 200x field	3
Ballooning	None	0
	Few balloon cells	1
	Many cells	2
	Prominent ballooning	

Fonte: Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. HEPATOLOGY 2005;41:1313-21¹⁶⁴

1.1.5 Modelo Experimental de EHNA induzida por Dieta Deficiente de Metionina e Colina

As dietas experimentais facilitam a rotina dos pesquisadores, proporcionando resultados rápidos com a implementação das doenças para o seu estudo. Ao permitir o melhor entendimento da fisiopatologia, ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na transição da esteatose para a EHNA, bem como testar o resultado das várias drogas disponíveis para o seu tratamento⁷ e, o uso de modelos experimentais de EHNA é de fundamental importância.

Neste sentido, ressalta-se que o desenvolvimento de modelos experimentais característicos da fisiopatologia da EHNA, bem como suas complicações e a utilização de uma terapêutica adequada pode auxiliar no entendimento e na explicação da doença. Nos estudos experimentais pode-se controlar a heterogeneidade genética, as diferenças entre o gênero, os fatores ambientais e o modo de vida, já que todos os animais utilizados nos estudos passaram por situações semelhantes¹⁰.

Tendo em vista a eficácia da utilização de estudos experimentais nesta doença são determinantes os custos operacionais utilizados em cada investigação e o tempo de indução da doença. Para o esclarecimento do real efeito da uma terapia medicamentosa, bem como o acompanhamento da evolução natural da doença, é fundamental a escolha de um modelo experimental efetivo e condizente para o desenvolvimento da EHNA.

A indução da EHNA tem sido realizada de diferentes maneiras: por indução medicamentosa⁷⁷⁻⁷⁹: tetraciclina, amiodarona, corticoesteróides, etc; com a utilização de ratos geneticamente obesos ou com manipulação genética e com a utilização de dietas que promovem a sua ocorrência, seja por serem ricas em gorduras, seja por restrição de aminoácidos^{79, 80}.

O modelo empregado na indução de esteato-hepatite não alcoólica através do uso de uma dieta deficiente em aminoácidos essenciais como a metionina e a colina é bem aceito na comunidade científica^{12, 81}. Porém, todos os trâmites e custos envolvidos na importação desta ração dificultam sua utilização em países em desenvolvimento, como o Brasil.

A dieta deficiente de metionina e colina (MCD) é uma dieta rica em sacarose (40%) e gordura (10%), porém com falta de dois componentes essenciais, a metionina e a colina¹⁰, os principais agentes precursores da EHNA neste modelo. A colina é uma amina essencial que faz parte do complexo B de vitaminas. Está presente nos lipídios da membrana celular e no neurotransmissor acetilcolina. A ingestão diária recomendada está entre 425-550 mg para adultos e suas fontes são a gema do ovo, feijão, soja e semelhantes, lecitina de soja e outros⁸².

A colina é necessária para a síntese de fosfolipídios da membrana celular, no metabolismo do metil, neurotransmissão colinérgica, sinalização transmembrana, no transporte e no metabolismo do colesterol lipídico⁸³.

O debate quanto ao uso de colina na dieta humana se dá devido ao metabolismo da fosfatidil-colina por fosfolipases ou a síntese *de novo* da colina⁸⁴. No fígado, ocorre a biossíntese da porção colina através da metilação sequencial de fosfatidiletanolamina, usando S-adenosilmetionina como o doador de metil⁸⁵.

Esta capacidade da síntese *de novo* de colina significa que a demanda de colina possa, em parte, ser atendida pelos grupos metílicos derivados do metabolismo do carbono (via metil-folato e metionina). Devido a essa interrelação da colina, metionina, ácido fólico e vitaminas B6 e B12, acredita-se que, mesmo quando os nutrientes estão disponíveis em quantidades suficientes para sustentar o crescimento normal e a função, as taxas de síntese *de novo* da colina não são suficientes para atender a demanda essencial da colina⁸².

O acúmulo de gordura no fígado, resultante da deficiência de colina, ocorre porque a colina é necessária para fazer a porção fosfatidil-colina nas partículas de VLDL (lipoproteínas de baixíssima densidade)^{86, 87}. Na ausência de colina, VLDL não é secretado e o triacilglicerol (triglicerídeo) acumula no citosol hepático.

O outro componente escasso na dieta MCD é a metionina, um aminoácido essencial que é convertido em S-adenosilmetionina e utilizado por metiltransferases que agregam o grupo metil ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e forma S-adenosil-homocisteína que é hidrolisada em adenosina e homocisteína⁸⁸.

Quando a metionina está presente em excesso, a glicina n-metiltransferase e a cistationa beta-sintase são ativadas por importantes rotas regulatórias, utilizando o excesso de $-CH_3$ para converter a glicina em n-metilglicina e, depois, condensar a homocisteína com a

serina para formar cistationina, a qual é clivada por gama-cistationases, formando cisteína e alfa-quetobutirato. Quando a metionina está em baixa quantidade, as atividades das duas enzimas de regulação são decrescidas com o início da reciclagem da homocisteína para metionina, através da enzima cobalamina dependente de metionina-sintase, a qual simultaneamente converte 5-CH₃-tetrahydrofolato em tetrahydrofolato⁸⁹.

A cisteína, formada pela metionina, é o reagente limitante para a síntese de glutatona (GSH), principal antioxidante celular. Sendo assim, dois importantes sistemas homeostáticos estão interligados e coordenadamente regulados pelo metabolismo da metionina, a metilação celular e o sistema de tampão redox⁸⁸.

A deficiência de metionina e dos demais fatores lipotrópicos (folato, B12, colina) são preditivos de esteatose hepática. Além disso, há menor formação de S-adenosilmetionina com menor ativação de folato, do tRNA, da síntese de creatina, lecitina e norepinefrina⁹⁰.

1.2 Estresse Oxidativo e Antioxidantes

1.2.1 Radicais Livres e Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio é um elemento vital e também potencialmente nocivo para as células. Em certas condições, é responsável por reações químicas extremamente tóxicas⁹¹.

A molécula de oxigênio, em seu estado natural, é um birradical que possui dois elétrons com *spin* de mesmo sentido (elétron gravita na mesma direção), o que lhe confere certa estabilidade e lhe impede de agir como um radical livre. Sendo que esta condição lhe confere características de potente oxidante, ou seja, aceitando elétrons de outras moléculas⁹².

Os intermediários da redução parcial do oxigênio são o ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio *singlet* (¹O₂) e radical hidroxil (OH[•]). Todos são

denominados espécies reativas de oxigênio por serem capazes de existir de forma independente⁹².

Os efeitos deletéreos do oxigênio sobre os organismos aeróbios variam consideravelmente com a espécie do organismo, com a idade, com o estado fisiológico e com a dieta, e os diferentes tecidos de um mesmo animal também podem ser afetados de formas diferentes⁹⁴. Esses efeitos ocorrem devido à elevada produção de radicais livres (RL) ou ERO.

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo espécies paramagnéticas, com alto grau de reatividade química e vida média curta, sendo capazes de atacar qualquer biomolécula^{95, 96}. Tais radicais podem ser formados em situações fisiológicas ou patológicas e são danosos às células e ao organismo quando produzidos em grandes quantidades, desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os antioxidante^{95, 97}.

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos nos processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias doenças, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, doenças do fígado, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral⁹⁸.

Os radicais livres podem ser formados durante o metabolismo normal de toda a célula, pela perda ou pelo ganho de um elétron de um não radical. Eles podem também ser formados quando uma ligação covalente é quebrada, na fissão homolítica cada um dos átomos fica com um elétron, formando um radical⁹⁶.

Os RL reagem através de ligações covalentes ou reações bioquímicas em cadeia. Na primeira situação, uma união covalente ocorre quando dois radicais formam um par, combinando os seus elétrons desemparelhados retirando do meio um radical. As reações bioquímicas em cadeia ocorrem quando reagem com outro não radical, e, ao final dessa reação, produzir-se-á outro radical. Além dessas duas vias, existem outras formas de obtenção de RL, através da fagocitose na resposta inflamatória, em situações de exposição do

organismo a radiações ionizantes, nas contaminações, poluição, no exercício e processos de doença^{97, 99}.

A excessiva formação endógena de RL pode ser causada por: (1) ativação aumentada de fagócitos; (2) interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial; (3) aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas; e (4) por níveis diminuídos das defesas antioxidantes. Entretanto, torna-se difícil determinar se na doença humana os radicais livres são a causa ou se potencializam o dano^{96, 100}. Por outro lado, as espécies reativas de oxigênio são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune^{101, 102}. Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema da NADPH oxidase que resulta em marcado incremento no consumo de oxigênio e consequente produção de ânion superóxido^{96, 100}.

As ERO formam-se durante a redução do oxigênio à água na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. O termo denominado radical livre é determinado quando uma espécie química, que pode ser um átomo como o hidrogênio ou um átomo de cloro, um metal de transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital¹⁰³. O elétron não pareado neste orbital confere alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para esse orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados destas moléculas têm sido detectadas em pacientes com uma variedade de doenças. A estabilidade do RL é adquirida por remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico¹⁰⁴.

As ERO, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser formadas durante o metabolismo normal de qualquer célula através da perda de elétrons ou pelo ganho de um elétron por não radical e estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade oxidativa⁹⁶.

Nas membranas mitocondriais encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente do complexo citocromo que reduzem uma molécula de oxigênio (O_2) à água (H_2O) durante o processo de respiração. A redução completa de uma molécula de O_2 à H_2O

requer quatro elétrons, sendo assim 95 a 98% de O_2 recebe quatro elétrons de uma só vez, através do sistema complexo citocromo-oxidase, na redução tetraeletrônica. Na redução monoelétrica, ocorre a formação de espécies intermediárias ou reativas do oxigênio (ERO). Dois desses intermediários são chamados de RL, são eles o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet})¹⁰⁴. A maior parte do O_2 (aproximadamente 95%) recebe os quatro elétrons de uma só vez, através do sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos, denominados espécies reativas de oxigênio^{93, 105}.

Nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à água no final da respiração mitocondrial (Figura 2). A molécula de O_2 mantém-se unida ao complexo IV da cadeia respiratória até que ocorra a redução total do O_2 em água. Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre a redução parcial do O_2 , gerando ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Com a adição de um hidrogênio ao ânion superóxido, este se reduz a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá a formação de um radical hidroxil (OH^{\bullet}). Desse modo, a formação de radicais ou de espécies reativas de oxigênio deve-se ao fato do O_2 se reduzir à água de forma monovalente, o que permite a geração de moléculas ou íons reativos durante o processo de redução do oxigênio¹⁰⁶.

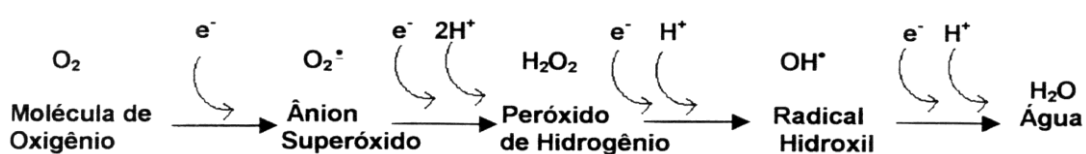
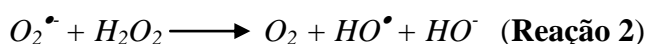
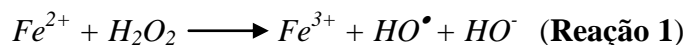


Figura 2. Esquema da redução do O_2 em H_2O , na respiração mitocondrial e a redução das ERO¹⁰⁷.

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é constituído pela redução do O_2 molecular por um elétron, após aporte energético. Normalmente, é removido pela reação de dismutação, que consiste na reação de ânions superóxido catalisados pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 , é normalmente produto da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD. As enzimas oxidativas são capazes de formar e degradar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e essas enzimas são encontradas nos peroxissomas. Dentre as mais comuns, encontram-se catalase (CAT), D-

amino oxidase, urato oxidase, B-oxidase de ácidos graxos e glutathione peroxidase (GPx). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, pode reagir com outro ânion superóxido, ou com metais de transição, conforme as reações de Fenton (Reação 1) e Haber-Weiss (Reação 2), formando o radical hidroxil (OH^\bullet)⁹⁵.



O radical hidroxil é uma ERO instável, sendo um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos devido à sua meia-vida muito curta. Esses radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Esse RL possui a capacidade de atravessar as membranas e reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia-vida⁹⁶.

O radical OH^\bullet é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante¹⁰⁸. O ferro reduzido (Fe^{2+}) desenvolve uma importante rota na geração de radicais tóxicos, particularmente quando reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)¹⁰⁹. O radical hidroxil é formado quando o H_2O_2 reage com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), com catálise de íons divalentes de metais de transição como ferro e cobre, através da reação descrita por Haber-Weiss no ano de 1934⁹⁶. É usualmente aceito que os efeitos tóxicos dos íons ferro são consequências da decomposição catalítica pelos íons Fe^{2+} do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos para a forma ativa do radical hidroxil, conforme reação. Acredita-se que essas reações sejam o passo inicial de muitos processos de danos causados por radicais livres, como LPO, modificação oxidativa de proteínas e lipoproteínas, e aumento de anomalias em cromossomos⁹⁹.

A síntese prejudicada de VLDL e a diminuição da quantidade de proteínas de ligação a ácidos graxos encontrada na EHNA limitam a capacidade dos hepatócitos de se livrar do excesso de gordura¹¹⁰. A exposição dos hepatócitos ao excesso de ácidos graxos livres leva em sequência à permeabilização lisossômica, redistribuição de catepsinas para o citosol, despolarização mitocondrial, liberação de citocromo C e o subsequente aumento de ERO.

Essa via fornece possível vínculo entre o acúmulo de AGL e uma série de processos concomitantes, como a peroxidação lipídica e os mecanismos pró-inflamatórios, bem como a ativação de vias pró-apoptóticas¹¹¹.

Acredita-se que na EHNA a função mitocondrial esteja diminuída devida a alterações ultraestruturais que resultam em um oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória, gerando aumento de ERO que podem atacar ácidos graxos poli-insaturados e iniciar a peroxidação lipídica. Na depleção da oxidação mitocondrial, mecanismos alternativos de oxidação são ativados, como a betaoxidação nos peroxissomos e a ômega-oxidação microsomal, resultando na formação adicional de ERO.

A inflamação também desempenha importante papel na progressão da EHNA. No fígado gorduroso ocorre aumento importante na expressão de genes pró-inflamatórios¹¹². Nessas condições, se tem observado uma ativação do fator de transcrição NF- κ B, pela união de fatores como o estresse oxidativo e a esteato-hepatite, existindo aumento da produção de citocinas como interleucina IL-1, IL-6 y TNF α ^{113, 114}. Essas citocinas participam do desenvolvimento da resistência à insulina e da ativação de macrófagos hepáticos, as células de Kupffer¹¹⁵. Em vários trabalhos já se têm demonstrado o aumento nos níveis de TNF α , tanto no soro como no tecido hepático de pacientes com EHNA que poderia ser gerado pelo acúmulo de gordura e pelo desenvolvimento da resistência à insulina^{116, 117}. Este efeito poderia estar envolvido o receptor de insulina IRS-2 por diminuir a fosforilação de sua tirosina através de um mecanismo mediado por MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)¹¹⁸. Essas ações do TNF α estão mediadas, pelo menos em parte, pela alteração da função mitocondrial e pelo estresse oxidativo¹¹⁹.

Dessa forma, o processo inflamatório que se desenvolve na EHNA parece alterar os mecanismos de sinalização do receptor de insulina, processo que desempenha um papel importante no aumento do estresse oxidativo¹²⁰. Ao contrário das influências pró-inflamatórias, se encontram a ação de uma família de receptores hormonais nucleares denominada PPARP ou receptores ativados pela proliferação de peroxissomas, que regulam tanto a inflamação como o metabolismo lipídico. Os PPARP induzem o catabolismo de ácidos graxos, prevenindo a deposição de gordura no fígado¹²¹.

Particularmente, PPARP α regula a expressão de genes implicados na resposta inflamatória, interferindo em vias de sinalização dependente do NF- κ B, influenciando na

produção de citocinas e na atração de monócitos aos locais de inflamação, e inibindo, entre outros genes pró-inflamatórios, a expressão do gene da enzima ciclooxigenase (COX-2), que aparece sempre aumentada EHNA^{114, 122}.

Como mecanismo compensador do processo oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas responsáveis pelo reparo de danos já instalados^{96, 98}.

Logo, em condições fisiológicas, o balanço entre agentes oxidantes e defesas antioxidantes mantém-se equilibrado. Quando ocorre aumento na produção de ERO, diminuição das defesas antioxidantes ou ambas as situações, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é rompido em favor dos agentes oxidantes e, nessa situação, diz-se que a célula ou o organismo encontra-se sob estresse oxidativo com potenciais danos⁹².

1.2.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas e Não Enzimáticas

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações – comparadas àquelas de um substrato oxidável – atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (o termo oxidável inclui macromoléculas tais como proteínas, lipídios, hidrato de carbono e DNA). A função desses compostos é manter os níveis intracelulares de ERO em baixas concentrações, e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas¹²³.

As defesas antioxidantes compreendem agentes que cataliticamente removem RL e outras espécies ativas como as enzimas SOD, CAT e GPx; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como íons ferro e cobre ou como transferinas e hepatoglobinas; proteínas que protegem biomoléculas contra dano por outros mecanismos, como proteínas de choque térmico; e substâncias de baixo peso molecular que combatem

ERO e EAN (espécies ativas de nitrogênio) como glutatona, α -tocoferol, ácido úrico, bilirrubina e outros¹⁰².

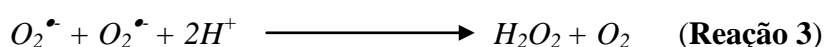
A atividade das defesas antioxidantes varia com o tipo celular, e possivelmente, em diferentes células do mesmo tecido⁹⁶. O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados⁹⁸. Quando a substância age neutralizando as ERO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de *scavenger*. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de *quencher*¹²⁴.

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de ERO, sendo assim, podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a processos de doença.

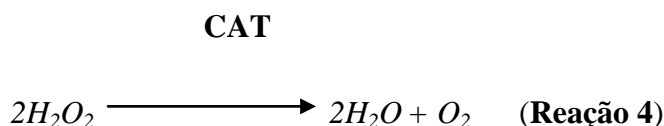
O sistema enzimático encarregado da detoxificação das ERO é formado por várias enzimas, das quais se pode destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), sendo que cada uma delas desempenha papel específico no controle do balanço oxidativo.

A SOD tem por principal função atuar na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 e O_2 , sendo que o primeiro é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (Reação 3). Essa enzima pode ser classificada em três grandes grupos, segundo o metal que se encontra presente no sítio ativo: a Cu-ZnSOD, localizada no citosol; a MnSOD, presente na matriz mitocondrial, e a FeSOD, existente somente nos procariontes e plantas¹²⁵.

SOD



Os produtos finais da dismutação são o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical, facilmente reage, originando o radical hidroxil. A remoção dos peróxidos ocorre por meio das enzimas CAT e da GPx, tendo a CAT mais afinidade ao peróxido de hidrogênio, de metila e etila, enquanto a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos¹²⁶. A ação da CAT sobre o peróxido é apresentada na Reação 4.



Entre as peroxidases que geralmente usam o grupo heme, sobressai-se a atividade da GP_X, que se localiza no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Para reestabelecer a glutathiona oxidada (GSSH) à reduzida, é necessário que a glutathiona redutase (GR) promova a regeneração da GSSH, consumindo NADPH, conforme demonstrado na Figura 3⁹⁶.

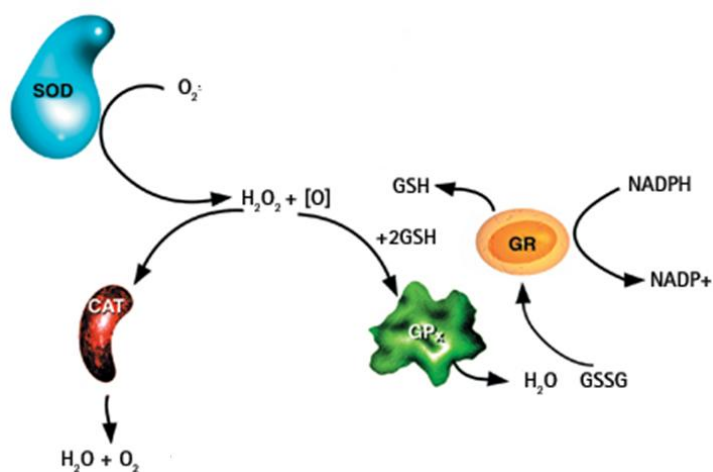


Figura 3. Esquema da interação entre as enzimas antioxidantes⁹⁶.

Assim como as enzimas antioxidantes, que removem radicais livres ou ERO antes que esses causem dano à membrana, existem substâncias que atuam como antioxidantes, evitando reações em cadeia como a LPO. Elas são conhecidas como defesas antioxidantes não

enzimáticas, sendo as mais conhecidas a glutatona, o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), β -carotenos e flavonoides^{97, 127-129}.

Essas substâncias, quando atuam, podem evitar a formação de RL ou ERO, suprimir uma cadeia de peroxidação na fase de propagação e reparar ou reconstruir a membrana. A glutatona é um tripeptídeo de ácido α -glutamínico, cisteína e glicina que, além de ser um importante antioxidante não enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase e a glutatona transferase, logo, uma alta concentração de GSH intracelular protege a célula contra a ação de ERO, reagindo por via não enzimática com essas espécies. A sua ação deve-se à presença de um grupamento sulfidríla, que atua como doador de elétrons⁹⁸.

A vitamina C é um composto hidrossolúvel que atua como cossustrato na biossíntese do colágeno, catecolaminas e carnitina. Atua como *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ e $OH^{\bullet-}$ com a formação de um composto intermediário que vem reduzido sucessivamente pela GSH⁹⁵.

A forma da vitamina E com maior atividade química é o α -tocoferol, que é um composto lipossolúvel, presente em altas concentrações em muitos tecidos, em nível intracelular e está presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas. Sua ação, como antioxidante, está associada à inibição da peroxidação de lipídios. Após reagir com radicais peroxil, retorna à forma de α -tocoferol pela ação do ascorbato¹³⁰.

Os β -carotenos têm sido considerados porque apresentam a capacidade de neutralizar radicais. Eles agem principalmente com o oxigênio *singlet*, sendo que sua utilização ocorre em concentrações baixas, têm afinidade à luz e absorvem a energia de excitação do radical¹³¹.

Os flavonoides são encontrados nas folhas e partes externas das plantas. Para proteger os tecidos da ação oxidativa, é descrito por vários autores que fitoterápicos, entre eles os flavonoides, possuem atividade antioxidante. Alguns, como a rutina e a quercetina, estão sendo estudados e estão apresentando bons resultados como antioxidantes^{97, 127-129, 132, 133}.

Investigações são necessárias para discutir os mecanismos dos efeitos dos antioxidantes e sua capacidade de interação com as membranas, esclarecendo pontos ainda obscuros para a interface clínico-terapêutica.

1.3 O Flavonóide Quercetina

Os antioxidantes possuem a função de manter os níveis intracelulares de ERO em baixas concentrações, e, para isso, atuam prevenindo a formação dessas espécies ou combatendo-as uma vez que tenham sido formadas¹²³.

Vários flavonóides têm sido referidos recentemente como eficazes para diminuir a inflamação e a fibrose em modelos animais¹²⁷. Flavonóides é o nome genérico de um grupo de moléculas formadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que se originam mediante uma via biossintética mista¹³⁴. São compostos que contêm grupos hidroxila fenólicos que lhes conferem uma ação antioxidante com importante potencial terapêutico e são encontrados na maçã, laranja, pêra, uva, melão, cereja, brócoli, batata, cebola, tomate, feijão, assim como também na cerveja, no chá, no vinho tinto e nos sucos de limão e laranja, os quais fazem parte da dieta humana de forma habitual¹³⁵.

Estima-se que diariamente a dieta ocidental contém, em média, 25 mg de flavonóides, dentre os quais a quercetina é o principal componente, sendo consumida em torno de 16 mg/dia, uma quantidade que pode ser farmacologicamente significativa para os fluidos e tecidos corporais¹³⁶.

A quercetina (Q) é um dos antioxidantes mais efetivos entre os flavonóides naturais e é representada por constituintes da dieta humana (frutas, vegetais, entre outros), protegendo as células contra as espécies ativas do oxigênio¹³⁷.

A quercetina é classificada como um flavonol (Figura 4) típico, cuja denominação científica é 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxil-4H-1-benzo-piran-4-ona, também denominado de 3,3',4',5,7-pentahidroxiavona pela Organização Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e apresenta capacidade de unir-se a polímeros biológicos tais como enzimas, transportadores de hormônios e DNA, podendo quelar íons metálicos de transição, tais como Fe^{2+} , Cu^{2+} , catalisar transporte de elétrons e depurar radicais livres. Considera-se que a quercetina tem excelente potencial antioxidante por suas propriedades anti-radicaais livres, fundamentalmente aos radicais hidroxila e superóxido, que são espécies consideradas altamente reativas e implicadas no início da cadeia de peroxidação lipídica^{134, 138, 139}.

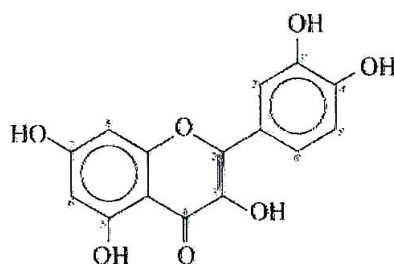


Figura 4. Estrutura química da quercetina¹⁶.

Hertog *et al*¹⁴⁰ encontraram altas concentrações de quercetina em cebola (284-486 mg/kg), couve (100 mg/kg), vagem (32-45 mg/kg), brócolis (30 mg/kg), repolho (14 mg/kg) e tomate (8 mg/kg). Entre as frutas estudadas, a concentração média de quercetina encontrada foi de 15 mg/kg, sendo que na maçã esta foi maior, entre 21 e 72 mg/kg. Em bebidas, como a cerveja, café, achocolatado e vinho branco, o teor foi de aproximadamente 1 mg/l. Já, para o vinho tinto, o teor observado foi de 4 -16 ml/l, suco de limão, 7 mg/l, suco de tomate, 3 mg/l e nos demais sucos, 5 mg/l. O chá preto é a bebida que apresenta maior concentração de quercetina, em torno de 10-25 mg/l.

Os grupos fenólicos possuem forte atividade antioxidante e potencial terapêutico em várias doenças, incluindo câncer, doenças isquêmicas do coração e aterosclerose¹⁶.

Para que um flavonóide apresente potente ação antioxidante, ou seja, atue como um varredor de RL, é necessário que esta molécula consiga doar elétrons para estabilizar um RL e que, ao ceder esses elétrons, rapidamente se estabilize¹⁴¹.

Acredita-se que essa capacidade de doar elétrons, com maior ou menor facilidade, potencializa a ação antioxidante dos flavonóides e está associada à relação estrutura-atividade de cada molécula. Para entender essa relação, é importante recordar a estrutura básica dos flavonóides que são compostos por 15 carbonos, distribuídos em 2 anéis fenólicos, conectados a unidade do carbono 3 e, normalmente, acoplados a uma molécula de açúcar, a qual incrementa sua solubilidade em água¹⁴¹.

Trabalhos experimentais, utilizando quercetina, obtiveram redução das lesões no tecido hepático e verificaram que a administração de Q aumenta as defesas antioxidantes,

reduz o dano oxidativo no fígado, a proliferação do ducto biliar e a fibrose. Além disso, verificaram que a melhor resposta obtida com a Q foi na dose de 150 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso corporal que corresponde a 50 mg/Kg de peso corporal utilizado neste trabalho^{97, 127, 128, 142}.

Pavanato e colaboradores, em 2003, verificaram que o tratamento de três semanas na dose de 50mg/Kg/dia na cirrose induzida por tetracloreto de carbono intraperitonealmente protegeu o fígado, reduziu o conteúdo de colágeno e diminuiu a expressão da iNOS e a peroxidação lipídica¹²⁷.

Estudos *in vitro* têm mostrado que a quercetina e outros flavonóides inibem fortemente a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral pelas células de Kupffer quando estimuladas pela doença¹⁴³.

A Q também tem sido relatada em vários estudos de apoptose, nos quais foi demonstrado que inibiu a apoptose induzida pelo peróxido de hidrogênio das células mesangiais, fibroblastos e células epiteliais¹⁴⁴.

Muitos efeitos dos flavonóides têm sido constatados sobre funções celulares, incluindo efeito mutagênico, antimutagênico, antiviral e citotóxico, além de antioxidante^{16, 145-147}. Tendo em vista as alterações hepáticas da esteato-hepatite não alcoólica e do fato de até o presente momento não haver tratamento efetivo para esta doença, que tem como um dos principais eventos a hiperprodução de citocinas, e conseqüentemente, o estresse oxidativo, gerando um mecanismo de feedback positivo para a inflamação com conseqüente fibrose, o estudo de substâncias que possam impedir ou diminuir esse eventos são de extrema relevância e importância no contexto atual das investigações sobre o tratamento da EHNA.

1.4 Avaliação de Atividade Genotóxica

Os testes de genotoxicidade detectam efeitos de substâncias tóxicas para o genoma. Os mais utilizados são aqueles que detectam mutações em células germinativas ou somáticas, por exemplo mutação gênica, associada a alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, ou em nível cromossômico, como aberrações e micronúcleos¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Uma vez lesado seu DNA, as

células respondem utilizando diferentes estratégias de ação, tais como morte por citotoxicidade ou apoptose, modulação da expressão gênica controlando o ciclo celular e a reparação do material genético por via livre ou sujeita a erro, sendo a segunda responsável pela fixação das mutações. Normalmente é a combinação desses fatores que compõe a resposta a danos genéticos¹⁵².

Os métodos que são amplamente empregados para a detecção de mutações gênicas são aqueles que utilizam as bactérias (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*)¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Esses são relativamente simples e reprodutíveis.

Para a detecção de mutações cromossômicas, os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que tais testes exigem que a célula esteja em seu estado proliferativo^{151, 153}. Esses testes têm validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Já para detectar quebras no DNA, tem sido recomendado o teste alcalino eletroforético de célula única ou ensaio cometa (EC), sendo este realizado em células individuais, não necessariamente em proliferação^{154, 155}.

Denominado de eletroforese de célula única (*Single cell electrophoresis test*) ou ensaio cometa, esta metodologia foi descrita por Singh et al. (1988) e modificada por Speit e Hartmann (1999)¹⁵⁶. É um ensaio de genética toxicológica usado para se avaliar a genotoxicidade de um composto. É ainda descrito como um teste rápido e que não requer grande quantidade de amostra, poder ser aplicado em diferentes tecidos dos quais se obtêm suspensões de determinadas células e considerado um ensaio de alta sensibilidade e especificidade¹⁵⁷.

O ensaio cometa permite a detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste cometa são passíveis de correção, principalmente por compostos bioativos encontrados nos alimentos e identificados como antimutagênicos¹⁵⁸.

Tendo em vista estas considerações, objetivou-se desenvolver um modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica avaliando a eficácia do modelo, o envolvimento do estresse oxidativo hepático, os danos causados ao DNA e os transcritores

celulares envolvidos nessa doença, bem como a ação do flavonoide quercetina como antioxidante neste modelo experimental.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral desenvolver um modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica através da utilização de uma dieta deficiente dos aminoácidos essenciais metionina e colina, verificando os efeitos do flavonoide quercetina como agente antígeno-tóxico e antioxidante nos tecidos hepáticos de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Experimento I

-Desenvolver um modelo experimental de EHNA (Esteato-Hepatite Não Alcoólica) utilizando uma dieta deficiente de metionina e colina (MCD) que seja eficaz, com fácil aquisição e custos adequados ao nosso centro de investigação.

-Comprovar a efetividade da dieta MCD e sua aceitação pelos animais, bem como as características da EHNA induzida, validando o modelo experimental.

-Verificar através de estudos morfológicos e histopatológicos a eficiência do modelo.

-Averiguar por análises bioquímicas as alterações hepáticas por aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e, sistêmicas por

glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL (lipoproteínas de alta densidade) e VLDL (lipoproteínas de baixíssima densidade).

-Verificar os níveis de lipoperoxidação pela técnica das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e analisar as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona total (GSH total) no fígado.

2.2.2 Experimento IIa

-Através de um modelo de EHNA utilizando a ração MCD produzida nacionalmente, verificar as alterações hepáticas, de estresse oxidativo e de danos de DNA, bem como os efeitos resultantes de uma suplementação com o flavonóide quercetina.

-Verificar morfológica e histologicamente os efeitos da suplementação de quercetina no modelo experimental de EHNA.

-Identificar as alterações de integridade hepática dos camundongos com EHNA e dos submetidos à administração de quercetina através da análise das enzimas AST, ALT e FA, bem como as alterações bioquímicas sistêmicas de colesterol total, HDL, glicemia e triglicerídeos.

-Determinar os níveis de lipoperoxidação hepática por TBARS e das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

-Avaliar os danos ao DNA no modelo de EHNA induzida por dieta MCD e a ação da quercetina como agente genotóxico/antigenotóxico, utilizando o ensaio cometa em tecido hepático.

2.2.3 Experimento IIb

-Por meio um modelo de EHNA utilizando a ração MCD produzida nacionalmente em camundongos C57BL/6 suplementados com o flavonoide quercetina (50mg/kg), verificar as alterações hepáticas e os parâmetros inflamatórios e de fibrose.

-Verificar histologicamente e através de avaliação imuno-histoquímica os efeitos da suplementação de quercetina no modelo experimental de EHNA.

-Identificar as alterações de integridade hepática dos camundongos com EHNA e dos submetidos à administração de quercetina através da análise das enzimas AST, ALT e FA.

- Avaliar os níveis de RNAm de TNF- α , COX-2, TGF- β , HMGB-1, MMP-9, CTGF e AREG em tecido hepático dos diferentes grupos estudados.

- Verificar a expressão da proteína JNK total e fosforilada e a do TLR-4 em tecido hepático dos animais.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento I

3.1.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo, de caráter experimental quantitativo e qualitativo, onde foram empregados camundongos C57BL/6 normais e camundongos C57BL/6 com EHNA induzidos por alimentação deficiente de metionina e colina. Conforme apresentado no artigo¹¹: *Methionine- and Choline-Deficient Diet Induce Hepatic Changes Characteristic of Non-Alcoholic Steatohepatitis*. Arq. Gastroenterol. V.48, nº 1, 2011.

3.1.2 Delineamento Experimental

3.1.2.1 Animais

Para realização deste trabalho utilizou-se camundongos da linhagem C57BL/6, com peso médio no início dos experimentos de 15 a 20 g, com 08 semanas de vida, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os

animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, tendo por dimensões 41x34x16 cm, forradas com maravalha.

Os animais foram tratados diariamente com água *ad libitum*. As caixas foram limpas de acordo com a rotina do Centro de Pesquisa e os animais mantidos em uma temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas).

A dieta deficiente em metionina e colina (MCD) foi preparada, sob nossa solicitação e orientação, pela empresa brasileira PragSoluções Biociências[®], de acordo com o descrito por NEWBERNE e CAMARGO¹⁵⁹, com modificações¹¹ (Composição da Dieta em Anexos). Foram desenvolvidas duas rações: a MCD e a ração controle, que é idêntica à anterior, porém contem as quantidades necessárias dos aminoácidos.

3.1.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde contidas no Manual de Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)¹⁶⁰ bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals*.

O número de animais utilizados no estudo ampara-se em cálculo amostral, o qual refere que, para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando-se $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, sete animais por grupo. Neste experimento foram utilizados quinze animais por grupo.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e solicitado fomento junto ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA.

3.1.2.3 Modelo Experimental

A indução da EHNA foi realizada através da oferta *ad libitum* da ração MCD durante 2 semanas. Os animais do grupo controle receberam a mesma ração, porém com a inclusão de metionina e colina nas concentrações descritas em seu composto.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos: a) controle (CO): 15 camundongos receberam a ração controle (com a adição de metionina e colina) durante 2 semanas; b) esteato-hepatite não alcoólica (EHNA): 15 camundongos receberam a dieta MCD durante 2 semanas.

Todos os animais receberam, uma semana antes de começar o experimento, a ração controle para adaptação à nova alimentação.

3.1.2.4 Eutanásia dos animais

No primeiro dia de experimento foi realizada a distribuição aleatória dos animais nos grupos de estudo e ofertada a ração correspondente. Os animais foram pesados e monitorados semanalmente durante o experimento.

Transcorrido o período de tempo (2 semanas), os animais foram pesados e receberam anestesia inalatória com Isoflurano[®] para realização da coleta de sangue do plexo retro-orbital.

Os animais sofreram eutanásia, ao final do experimento, por exanguinação sob anestesia profunda, seguida de deslocamento cervical conforme descrito em AVMA Guidelines from Euthanasia¹⁶¹. Para a retirada do fígado, foi realizada uma laparotomia ventral média com hepatectomia total e preparo do material para análise histológica e congelamento em nitrogênio líquido do tecido restante.

Os fígados foram seccionados e os seus lobos divididos em uma fração para histologia, fixados em solução de formol a 10% por 24 horas e emblocados em parafina para posterior coloração. O restante do tecido foi utilizado para as demais análises.

Os corpos dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para desprezo e mantidos em freezer até sua incineração realizada pelo setor responsável do Centro de Investigação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.1.2.5 Análise Histopatológica

Para realização da análise microscópica, as lâminas dos fragmentos hepáticos foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e picrossírius, sendo analisadas por um único patologista “cegado”, ou seja, sem conhecimento dos grupos em relação aos animais, no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz.

O critério histológico mínimo para o diagnóstico de EHNA foi a presença de esteatose associada à balonização hepatocelular, envolvendo a zona 3 e infiltrado inflamatório lobular¹⁶². Os corpúsculos de Mallory e a fibrose sinusoidal, envolvendo a zona 3, podiam ou não estar presentes¹⁶³. A graduação tanto da atividade necroinflamatória como da fibrose foi realizada, segundo a classificação proposta por BRUNT *et al.*¹⁶². O escore utilizado para a classificação da EHNA foi o recomendado pelo *Pathology Committee of EHNA Clinical Research Network*¹⁶⁴, classificando semi-quantitativamente esteatose (0-3), inflamação lobular (0-2), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4).

Na coloração com picrossírius vermelho, a análise qualitativa foi realizada em microscópio binocular Nikon Labophot (Tokyo, Japan). A porcentagem de fibrose no tecido hepático foi determinada por análise histomorfométrica em microscópio equipado com câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Depois de analisar vinte campos randomizados por imagem, as razões do tecido conjuntivo em relação a todo o fígado foram calculadas, com resultados em pixels.

3.1.2.6 Análises Bioquímicas e de Integridade Hepática

Para verificação das análises bioquímicas sistêmicas realizaram-se as medidas de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de ultra baixa densidade (VLDL).

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Glicose PAP, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500nm.

Para determinação dos níveis de triglicerídeos foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Triglicerídeos Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente será misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 410nm. Os triglicerídeos foram hidrolisados enzimaticamente por uma lipase específica, produzindo glicerol e ácido graxo. O glicerol se oxidou com ácido perclórico à formoladeído, que foi quantificado colorimetricamente a 410 nm como 3,5-diacetil-1,4-diideoludina ¹⁶⁵.

Para determinação dos níveis de colesterol total, HDL e VLDL foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Colesterol Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500nm. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pelas colesterol esterases à colesterol livres e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase à colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-amino-antipirilquironimina teve absorvidade máxima em 500nm ¹⁶⁶.

Para verificação da integridade hepática foram utilizadas as dosagens sanguíneas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Na determinação da AST e da ALT no plasma foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática do AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A AST catalisou a reação do α -cetogluturato e do ácido alanina sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisou a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisou a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase (POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em presença de POD, o H_2O_2 oxidou a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

Para determinação da atividade da FA no plasma foi empregado o método enzimático automatizado. Para isto, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, um composto intensamente amarelo, com um máximo de absorbância de 400 nm.

3.1.2.7 Análises de Lipoperoxidação e das Enzimas Antioxidantes

Após a morte dos animais, o fígado foi rapidamente retirado e homogeneizado durante 30 segundos em Ultra-Turrax (IKA-WERK), na presença de KCl 1,15% (9 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas, cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g) em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores¹⁶⁷.

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 μ L). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μ L) em 780 μ L de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de $NaHCO_3$, 0,5 mL do reativo B1 ($CuSO_4 \cdot H_2O$ 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu

diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos a solução adquiria uma coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro, a 625 nm¹⁶⁸.

A Lipoperoxidação (LPO) foi determinada por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é bastante utilizada para medir o dano dos lipídios de membrana, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos¹⁶⁹.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testada na presença de ácido tiobarbitúrico, que forma um meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Foram colocados em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitaram-se os tubos, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados, e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico, para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína¹⁶⁹.

A enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10⁴ vezes maior do que a velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico¹⁷⁰. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM)^{171, 172}.

A técnica está baseada da inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de

detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM). A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/mg de proteína (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina)¹⁷⁰.

A enzima catalase (CAT) é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila. No homem, a CAT é uma hemoproteína e catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio¹⁷³. A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio a 50 mM e pH 7,4, e peróxido de hidrogênio 0,3 M. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 µL do tampão fosfato e 10 µL de amostra do tecido, sendo essa cubeta colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 µL do peróxido de hidrogênio para o tecido e foi feito o monitoramento da diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (µmoles de H₂O₂), no comprimento de onda de 240 nm¹⁷³.

As quantidades de GSH e GSSG intracelulares, bem como a relação entre as concentrações desses dois metabólitos fornecem o índice do estado redox intracelular. Para as análises de GSH foi utilizada a técnica onde os fígados foram homogeneizados com 5% (w/v) de ácido metafosfórico. Após a centrifugação (16000 xg, durante 2 minutos), o tecido homogeneizado foi avaliado espectrofotometricamente (415 nm) em um leitor de microplacas, por modificação do 5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoic acid) [DTNB, Sigma]/GSSG reductase (Sigma) método de reciclagem, utilizando o N-ethylmaleimide (NEM, Fluka), conjugando a técnica para a preparação da amostra GSSG. Amostras (10 ml) tanto para GSH e determinações GSSG, foram analisadas em 105 mL volumes, em placas de 96 poços de

poliestireno (Corning) a 37° C na presença de 10 mM DTNB, 0.17mm β -NADPH (Sigma, dissolvido em 0,5% (w/v) de NaHCO₃ como um agente estabilizador) e 0,5 U/ml GSSG reductase. Os resultados foram expressos em μ mol/mg de proteína¹⁷⁴.

3.1.2.8 Análises Estatísticas

Os dados das análises são apresentados como média \pm erro padrão e tratados estatisticamente pelo Teste “t” de *Student* para amostras independentes, com um nível de significância mínima de 5% (p<0,05).

3.2 Experimento IIa

3.2.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo, de caráter experimental quantitativo e qualitativo, onde foram empregados camundongos C57BL/6 normais e com EHNA induzidos por alimentação deficiente de metionina e colina, suplementados com o antioxidante quercetina. Segundo apresentação no artigo: *The use of Antioxidant Quercetin in Preventing Liver DNA Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis*, submetido à *Digestive Diseases and Sciences*, ISSN: 0163-2116.

3.2.2 Delineamento Experimental

3.2.2.1 Animais

Para realização deste trabalho utilizou-se camundongos da linhagem C57BL/6, com peso médio no início dos experimentos de 15 a 20g, com 08 semanas de vida, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 41x34x16cm, forradas com maravalha.

Os animais foram tratados diariamente com água *ad libitum*. As caixas limpas de acordo com a rotina do Centro de Pesquisa e mantidos em uma temperatura de $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas).

A dieta deficiente em metionina e colina (MCD) foi preparada, sob nossa solicitação e orientação, pela empresa brasileira PragSoluções Biociências^{®11}. Foram desenvolvidas duas rações: a MCD e a ração controle, que é idêntica à anterior, porém contem as quantidades necessárias dos aminoácidos.

3.2.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)¹⁶⁰ bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals*.

O número de animais utilizados no estudo ampara-se em cálculo amostral, o qual refere que, para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 desvio

padrão (magnitude de grande efeito), considerando-se $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, doze animais por grupo. Neste experimento foram utilizados dezesseis animais por grupo.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo solicitando fomento junto ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA, com número de protocolo 09-050.

3.2.2.3 Modelo Experimental

A indução da EHNA foi realizada através da oferta *ad libitum* da ração MCD durante 4 semanas. Os animais do grupo controle receberam a mesma ração, porém com a inclusão de metionina e colina nas concentrações descritas em seu composto.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle + veículo (CO + V): 16 camundongos que receberam a ração controle (com a adição de metionina e colina) mais veículo; controle + quercetina (CO + Q) : 16 ratos que receberam a ração controle mais quercetina 50 mg / kg; esteato-hepatite não alcoólica + veículo (EHNA + V): 16 camundongos que receberam a dieta MCD mais veículos; e esteato-hepatite não alcoólica + quercetina (EHNA + Q): 16 camundongos que receberam a dieta MCD mais quercetina 50 mg / kg. Todos os animais receberam, uma semana antes de começar o experimento, a ração controle para adaptação à nova alimentação.

O veículo foi composto por carboximetilcelulose sódica (CMCNa) 1% e também tem utilizado como um portador para Q. A quercetina em 50 mg / kg de peso do animal foi usada por 4 semanas administrada intragastricamente, tendo sido definida previamente por estudo piloto.

No dia 1 do experimento, os animais foram aleatoriamente distribuídos para os grupos conforme a sua dieta correspondente. Os animais foram pesados e monitorados durante todo o experimento.

3.2.2.4 Eutanásia dos animais

Transcorrido o período de tempo (4 semanas), os animais foram pesados e receberam anestesia inalatória com Isoflurano[®] para realização da coleta de sangue do plexo retro-orbital.

Os animais sofreram eutanásia, ao final do experimento, por exanguinação sob anestesia profunda, seguida de deslocamento cervical, conforme descrito em *AVMA Guidelines from Euthanasia*¹⁶¹. Para a retirada do fígado, foi realizada uma laparotomia ventral média com hepatectomia total e preparo do material para análise histológica e congelamento em nitrogênio líquido do tecido restante.

Os fígados foram seccionados e os seus lobos divididos em uma fração para histologia, fixados em solução de formol a 10% por 24 horas e emblocados em parafina para posterior coloração. O restante do tecido foi utilizado para as demais análises.

Os corpos dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para desprezo e mantidos em freezer até sua incineração realizada pelo setor responsável do Centro de Investigação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.2.2.5 Análise Histopatológica

Para realização da análise microscópica, as lâminas dos fragmentos hepáticos foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), sendo analisadas por um único patologista, “cegado”, sem conhecimento dos grupos em relação aos animais, no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz.

O critério histológico mínimo para o diagnóstico de EHNA foi a presença de esteatose associada à balonização hepatocelular, envolvendo a zona 3 e infiltrado inflamatório lobular¹⁶². Os corpúsculos de Mallory e a fibrose sinusoidal, envolvendo a zona 3, podiam ou não estar presentes¹⁶³. A graduação tanto da atividade necroinflamatória como da fibrose foi realizada, segundo a classificação proposta por BRUNT *et al.*¹⁶². O escore utilizado para a

classificação da EHNA foi o recomendado pelo *Pathology Committee of NASH Clinical Research Network*¹⁶⁴, classificando semi-quantitativamente esteatose (0-3), inflamação lobular (0-2), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4).

A análise qualitativa foi realizada em microscópio binocular Nikon Labophot (Tokyo, Japan) equipado com câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

3.2.2.6 Análises Bioquímicas e de Integridade Hepática

Para verificação das análises bioquímicas sistêmicas realizaram-se as medidas de glicemia, triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Glicose PAP, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500nm.

Para determinação dos níveis de triglicerídeos foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Triglicerídeos Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente será misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 410nm. Os triglicerídeos foram hidrolisados enzimaticamente por uma lipase específica, produzindo glicerol e ácido graxo. O glicerol se oxidou com ácido perclórico à formolaldeído, que foi quantificado colorimetricamente a 410 nm como 3,5-diacetil-1,4-diideoludina¹⁶⁵.

Para determinação dos níveis de colesterol total, HDL foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Colesterol Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500nm. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pelas colesterol esterases à colesterol livres e ácidos graxos. O colesterol livre é

oxidado pela colesterol oxidase à colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-amino-antipirilquironimina teve absorvidade máxima em 500nm¹⁶⁶.

Para verificação da integridade hepática foram utilizadas as dosagens sanguíneas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotranferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Na determinação da AST e da ALT no plasma foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática do AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A AST catalisou a reação do α -cetogluturato e do ácido alanina sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisou a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisou a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase (POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Em presença de POD, o H₂O₂ oxidou a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

Para determinação da atividade da FA no plasma foi empregado o método enzimático automatizado. Para isto, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, um composto intensamente amarelo, com um máximo de absorbância de 400 nm.

3.2.2.7 Análises de Lipoperoxidação e das Enzimas Antioxidantes

Após a morte dos animais, o fígado foi rapidamente retirado e homogeneizado durante 30 segundos em Ultra-Turrax (IKA-WERK), na presença de KCl 1,15% (9 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 μ L por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g) em centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores¹⁶⁷.

A concentração de proteínas no homogeneizado de fígado foi determinada, utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1mg/mL (utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 μ L). Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μ L) em 780 μ L de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 ml de NaHCO_3 , 0,5 mL do reativo B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1%) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos a solução adquiria uma coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro, a 625 nm¹⁶⁸.

A Lipoperoxidação (LPO) foi determinada por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica é bastante utilizada para medir o dano dos lipídios de membrana, porque o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos¹⁶⁹.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testada na presença de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Foram colocados em tubo de ensaio, respectivamente, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,25mL de água destilada, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,25mL do homogeneizado. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação, formando uma base de Schiff, e o TCA desnatura as proteínas presentes, além de acidificar o meio de reação. A seguir, agitaram-se os tubo, os quais foram aquecidos à temperatura de 100° C, durante 15 minutos. Após, os tubos foram resfriados e acrescentou-se 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Os tubos foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e realizada a leitura em espectrofotômetro (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 535nm. A concentração de TBA-RS foi expressa em nmoles/mg de proteína¹⁶⁹.

A enzima superóxido dismutase (SOD), catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10⁴ vezes maior do que a velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico¹⁷⁰. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector (adrenalina). A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo,

observada a 480 nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10) e adrenalina (1 mM).

Para isso, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo $O_2^{\bullet-}$ que é o substrato da enzima. Antes de realizar a determinação com o homogeneizado, fez-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6) com 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0). Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionaram-se diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/mg de proteína, ou seja, quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina¹⁷⁰.

A enzima catalase (CAT) é altamente específica e possui atividade apenas para peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos de metila e etila. No homem, a CAT é uma hemoproteína e catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio¹⁷³. A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes: a solução tampão de fosfato de sódio a 50 mM e pH 7,4, e o peróxido de hidrogênio 0,3 M. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra do tecido, essa cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (μ moles de H_2O_2), no comprimento de onda de 240 nm¹⁷³.

3.2.2.8 Análises do Dano de DNA através do Ensaio Cometa

Foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa, utilizando sangue total, fígado e pulmão dos animais tratados e controles. Um pedaço de cada tecido foi colocado em *ependorff* contendo solução tamponada (PBS) pH 7.4 gelada e fragmentado com auxílio de uma pinça para obtenção de suspensão celular. O sangue foi coletado em *ependorfs*

heparinizados. As amostras de tecido em suspensão e o sangue foram misturados com uma fina camada de agarose *low melting* 0,75% e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%, sendo essas lâminas mergulhadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por, no mínimo, uma hora até, no máximo, 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. A lise celular permitiu migração dos fragmentos de DNA, a qual foi realizada após a incubação das lâminas em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) e subsequente aplicação de uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) às células lisadas sobre as lâminas para microscopia em uma cuba de eletroforese de DNA. As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de coloração com prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD). O ID foi obtido pela avaliação visual das classes de dano (de 0 – 4), extraindo-se um índice que expressa o dano geral sofrido por uma população de células; os núcleos intactos aparecem redondos (classe 0 – sem dano) e, já nas células lesadas, o DNA livre migrou do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante à de cometa. Foram classificados entre classes 1 (dano mínimo) a 4 (dano máximo). A FD foi calculada baseada no número de células com cauda versus aquelas sem cauda^{156, 175, 176}.

3.2.2.9 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão e analisados usando ANOVA com teste *post hoc* de Student Newman Keuls. A avaliação estatística dos dados obtidos no teste do cometa foi realizada pelo teste de Tukey. A avaliação estatística dos resultados histológicos foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes. Em todas as comparações foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

3.3 Experimento IIb

3.3.1 Delineamento da Pesquisa

Neste estudo de caráter experimental quantitativo e qualitativo foram utilizados camundongos C57BL/6 normais e com EHNA induzidos por alimentação deficiente de metionina e colina, suplementados com o antioxidante quercetina. Conforme apresentado no artigo: *Quercetin modulates the progression of inflammatory parameters and liver fibrosis in mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis*, a ser submetido à *Liver International Journal*, ISSN 1478-3223.

3.3.2 Delineamento Experimental

3.3.2.1 Animais

Para realização deste trabalho utilizou-se camundongos da linhagem C57BL/6, com peso médio no início dos experimentos de 15 a 20g, com 08 semanas de vida, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 41x34x16cm, forradas com maravalha.

Os animais foram tratados diariamente com água *ad libitum*. As caixas limpas de acordo com a rotina do Centro de Pesquisa e mantidos em uma temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas).

A dieta deficiente em metionina e colina (MCD) foi preparada, sob nossa solicitação e orientação, pela empresa brasileira PragSoluções Biociências^{®11}. Foram desenvolvidas duas rações: a MCD e a ração controle, que é idêntica à anterior, porém contem as quantidades necessárias dos aminoácidos.

3.3.2.2 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)¹⁶⁰ bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals*.

O número de animais utilizados no estudo amparou-se em cálculo amostral, o qual refere que, para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,8 desvio padrão (magnitude de grande efeito), considerando-se $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 90%, são necessários, no mínimo, oito animais por grupo.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e, solicitado fomento junto ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA, sob o número de protocolo 09-050.

3.3.2.3 Modelo Experimental

A indução da EHNA foi realizada através da oferta *ad libitum* da ração MCD durante 4 semanas. Os animais do grupo controle receberam a mesma ração, porém com a inclusão de metionina e colina nas concentrações descritas em seu composto.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: controle + veículo (CO + V): 8 camundongos receberam a ração controle (com a adição de metionina e colina) mais veículo; controle + quercetina (CO + Q) : 8 camundongos receberam a ração controle mais quercetina 50 mg / kg; esteato-hepatite não alcoólica + veículo (EHNA + V): 8 camundongos que receberam a dieta MCD mais veículos; e para o grupo esteato-hepatite não alcoólica + quercetina (EHNA + Q): 8 camundongos que receberam a dieta MCD mais quercetina 50 mg / kg. Todos os animais receberam, uma semana antes de começar o experimento, a ração controle para adaptação à nova alimentação.

Veículo foi composto por carboximetilcelulose sódica (CMCNa) 1% que também foi empregado como um portador para Q. A quercetina foi administrada intragastricamente em uma concentração de 50 mg / kg de peso do animal, por 4 semanas. Essa dose foi definida a partir de achados anteriores¹⁷⁷ e por estudo piloto.

No dia 1 do experimento, os animais foram aleatoriamente distribuídos para os grupos conforme a sua dieta correspondente. Os animais foram pesados e monitorados durante todo o experimento.

3.3.2.4 Eutanásia dos animais

Transcorrido o período de tempo (4 semanas), os animais foram pesados e receberam anestesia inalatória com Isoflurano[®] para realização da coleta de sangue do plexo retro-orbital.

Os animais sofreram eutanásia, ao final do experimento, por exanguinação sob anestesia profunda, seguida de deslocamento cervical conforme descrito em AVMA Guidelines from Euthanasia¹⁶¹. Para a retirada do fígado, foi realizada uma laparotomia ventral média com hepatectomia total e preparo do material para análise histológica e congelamento em nitrogênio líquido do tecido restante.

Os fígados foram seccionados e os seus lobos divididos em uma fração para histologia, fixados em solução de formol a 10% por 24 horas e emblocados em parafina para posterior coloração. O restante do tecido foi utilizado para as demais análises.

Os corpos dos animais foram acondicionados em embalagens específicas para desprezo e mantidos em freezer até sua incineração, realizada pelo setor responsável do Centro de Investigação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.3.2.5 Análise Histopatológica

Para realização da análise microscópica, as lâminas dos fragmentos hepáticos foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), sendo analisadas por um único patologista, “cegado”, sem conhecimento dos grupos em relação aos animais.

O critério histológico mínimo para o diagnóstico de EHNA foi a presença de esteatose associada à balonização hepatocelular, envolvendo a zona 3 e infiltrado inflamatório lobular¹⁶². Os corpúsculos de Mallory e a fibrose sinusoidal, envolvendo a zona 3, podiam ou não estar presentes¹⁶³. A graduação tanto da atividade necroinflamatória como da fibrose foi realizada, segundo a classificação proposta por BRUNT *et al.*¹⁶². O escore utilizado para a classificação da EHNA foi o recomendado pelo *Pathology Committee of EHNA Clinical Research Network*¹⁶⁴, classificando semi-quantitativamente esteatose (0-3), inflamação lobular (0-2), balonização hepatocelular (0-2) e fibrose (0-4).

A análise qualitativa foi realizada em microscópio binocular Nikon Labophot (Tokyo, Japan), equipado com câmera digital e conectado a um programa de captura de imagem (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

3.3.2.6 Análise Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada para verificação da ativação das células estreladas no tecido hepático e, como marcador para estas células ativadas, foi utilizada a α -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*). Foi utilizado anticorpo policlonal α -SMA (Abcam, Cambridge, UK). Cada secção foi desparafinizada com xilol e reidratada com diferentes graus de álcool. A recuperação de antígeno foi feita em micro-ondas (300W) em buffer citrato (pH 6.0) a 100°C, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas em metanol absoluto, contendo 3% de peróxido de hidrogênio, à temperatura ambiente. Os cortes foram sequencialmente pré-incubados com 10% de soro de coelho, à temperatura ambiente, para bloquear possíveis reações indesejadas do anticorpo secundário. As lâminas foram incubadas com anticorpo α -SMA na diluição 1:200. Após sessenta minutos em temperatura

ambiente, elas foram tratadas com reagente EnVision (Dako[®], Glostrup, Dinamarca). Logo, foram realizados três lavagens com PBS e 3,39-diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno. Os núcleos foram contracolorados com hematoxilina. O anticorpo primário foi diluído em PBS, contendo 0,1% de albumina bovina como controle negativo. Os resultados foram avaliados por um patologista “cegado”, sem conhecimento prévio dos grupos, através de microscópio equipado com câmera digital para captura de imagens através do software Image-Plus (Media Cybernetics, Bethesda, USA).

3.3.2.7 Análises Bioquímicas de Integridade Hepática

Para verificação da integridade hepática foram utilizadas as dosagens sanguíneas das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Na determinação da AST e da ALT no plasma foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática do AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A AST catalisou a reação do α -cetogluturato e do ácido alanina sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisou a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisou a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase (POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em presença de POD, o H_2O_2 oxidou a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

Para determinação da atividade da FA no plasma foi empregado o método enzimático automatizado. Para isto, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, um composto intensamente amarelo, com um máximo de absorbância de 400 nm.

3.3.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – PCR em tempo real

Para quantificar a concentração de RNAm, utilizou-se a metodologia de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real.

Primeiramente, foi realizada extração e purificação do RNA da amostra, mediante uso de um kit comercial (Promega Corporation, Madison, USA). Após esse procedimento, foi quantificado o total de RNA nas amostras, mediante utilização de espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, USA) e, posteriormente, realizou-se por meio do sistema High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)¹⁷⁸ a conversão de RNA a cDNA, baseando-se na capacidade da transcriptase reversa em sintetizar uma cadeia complementar de DNA (cDNA) a partir de uma sequência molde de RNA.

Como procedimento sequencial, realizou-se a técnica de PCR, em tempo real, de acordo com o descrito por Mullis e Faloona, em 1987, e por Saiki e colaboradores, em 1988, com base no processo natural de replicação do DNA com amplificação cíclica^{179, 180}. O método constou de três etapas: desnaturação, anelamento e alongamento, efetuados de forma sucessiva em condições controladas de temperatura e tempo.

Foram também utilizados os demais materiais, como sondas TaqMan para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Rn01525859_g1 e GenBank acesso n° NP036807.1), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (Rn01483828_m1 e GenBank acesso n° AF233596.1), fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (Rn00572010_m1 e GenBank acesso n° AY550025.1), proteína de alta mobilidade do grupo B1 (HMGB-1) (Rn02377062_g1 e GenBank acesso n° BC081839.1), metaloproteinase de matriz – 9 (MMP-9) (Rn00579162_m1 e GenBank acesso n° U24441.1), fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) (Rn01537279_g1 e GenBank acesso n° AB023068.1) e anfirregulina (AREG) (Rn00567471_m1 e GenBank acesso n° X55183.1). Esses genes foram avaliados através de ensaios de expressão TaqMan, sendo utilizado TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)¹⁸¹.

A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus, real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA). Em cada ensaio, foi incluído um controle vazio e um controle negativo. O número de ciclos transcritos detectados foram normalizados com o

número de ciclos para detecção do gene constitutivo HPRT (hipoxantina fosforibotransferase) (GenBank acesso n° M63983.1 e Rn01527840_m1), utilizado como *housekeeping*, que codifica para a hipoxantina fosforribosil transferase.

As mudanças relativas aos níveis de expressão gênica foram determinadas, conforme o descrito por Livak e Schmittgen, em 2001, mediante o cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁸¹.

3.3.2.9 Analises por Western Blotting

Foi utilizado o sistema descrito por Laemmli e colaboradores (1970) para a eletroforese ¹⁸², e para o *blotting*, a técnica descrita por Towbin e colaboradores (1979) ¹⁸³. Selecionou-se a quantidade de amostra equivalente a 30 µg de proteína. Adicionou-se uma solução de H₂O, tris/HCl 0,5 M, DTT 1% e azul de bromofenol, incubando-a durante cinco minutos a 100°C. Posteriormente, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Polifluorofuro de Vinilideno (PVDF), a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Para realizar a transferência, uma vez extraído o gel, este foi equilibrado em um tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol 20%). A transferência foi realizada a 13 V durante 25 minutos. A membrana foi lavada com agitação durante dez minutos com PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl), depois foi colocada durante trinta minutos em solução de bloqueio (leite em pó desnatado em PBS-Tween 20 frio) a 37°C.

A membrana de PVDF foi, então, incubada em *overnight* a 4° C com anticorpo primário policlonal específico para receptor toll-like 4 (TLR-4) (110 kDa) (Santa Cruz Biothecnology, Santa Cruz, USA), jun-amino-terminal quinase total e fosforilada (JNK/pJNK) (46 e 54 kDa) e GAPDH (Sigma Chemical CO[®], USA) (37 kDa), esse último utilizado para fins de cálculo. Após esse período, foi lavada seis vezes, durante dez minutos, com PBS-Tween 20. Posteriormente, foi incubada durante uma hora com anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido a HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido esse tempo, foi novamente lavada seis vezes, durante dez minutos, em PBS-Tween 20.

A detecção das proteínas foi realizada por quimiluminescência, utilizando um kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) e, posteriormente, foi introduzida em um cassete junto com o filme de revelação (Amersham Hyperfilm ECL, UK). Depois de revelado, o filme foi secado, e as bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (u. a.).

3.3.2.10 Análise Estatística

Médias e erro padrão foram calculados. Os dados foram analisados usando ANOVA. Quando um efeito significativo foi encontrado, comparações *post-hoc* foram realizadas utilizando o teste de Student Newman Keuls para amostras independentes. Para avaliar a significância estatística da análise histológica e imuno-histoquímica foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para amostras independentes. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os cálculos foram realizados utilizando o software estatístico SPSS 14.0.



4 RESULTADOS

4.1 Experimento I

METHIONINE- AND CHOLINE-DEFICIENT DIET INDUCES HEPATIC CHANGES CHARACTERISTIC OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

(Publicado em *Arq Gastroenterol.* v. 48 – no.1 – jan./mar. 2011)

METHIONINE- AND CHOLINE-DEFICIENT DIET INDUCES HEPATIC CHANGES CHARACTERISTIC OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Éder MARCOLIN¹, Luiz Felipe FORGIARINI², Juliana TIEPPO³, Alexandre Simões DIAS^{3,4}, Luiz Antonio Rodrigues de FREITAS⁵ and Norma Possa MARRONI⁶

ABSTRACT – Context - Non-alcoholic steatohepatitis is a disease with a high incidence, difficult diagnosis, and as yet no effective treatment. So, the use of experimental models for non-alcoholic steatohepatitis induction and the study of its routes of development have been studied. **Objectives** - This study was designed to develop an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis based on a methionine- and choline-deficient diet that is manufactured in Brazil so as to evaluate the liver alterations resulting from the disorder. **Methods** - Thirty male C57BL/6 mice divided in two groups (n = 15) were used: the experimental group fed a methionine- and choline-deficient diet manufactured by Brazilian company PragSoluções®, and the control group fed a normal diet, for a period of 2 weeks. The animals were then killed by exsanguination to sample blood for systemic biochemical analyses, and subsequently submitted to laparotomy with total hepatectomy and preparation of the material for histological analysis. The statistical analysis was done using the Student's *t*-test for independent samples, with significance level of 5%. **Results** - The mice that received the methionine- and choline-deficient diet showed weight loss and significant increase in hepatic damage enzymes, as well as decreased systemic levels of glycemia, triglycerides, total cholesterol, HDL and VLDL. The diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis was performed in 100% of the mice that were fed the methionine- and choline-deficient diet. All non-alcoholic steatohepatitis animals showed some degree of macrovesicular steatosis, ballooning, and inflammatory process. None of the animals which were fed the control diet presented histological alterations. All non-alcoholic steatohepatitis animals showed significantly increased lipoperoxidation and antioxidant enzyme GSH activity. **Conclusion** - The low cost and easily accessible methionine- and choline-deficient diet explored in this study is highly effective in inducing steatosis and steatohepatitis in animal model, alterations that are similar to those observed in human livers.

HEADINGS – Fatty liver. Methionine. Choline deficiency. Oxidative stress. Mice.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a clinical label used to characterize physiopathological states such as fat accumulation in the liver amounting to 5%-10% of its weight (steatosis), presence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and even hepatocellular carcinoma due to liver cirrhosis⁽⁴⁷⁾. NASH is characterized as fat accumulation in the hepatic tissue associated with various degrees of inflammation and progressive fibrosis⁽³⁶⁾.

NASH is the third commonest cause of liver disease among ambulatory patients^(17,20). In a population-based study conducted between 1997 and 1999 in the city of Porto Alegre (South Brazil), the prevalence of the disease was 3.18% in patients with changes at the aminotransferase

level⁽⁵⁰⁾. These findings may underestimate the real incidence of the disorder, as they include solely those patients who showed biochemical alterations only.

NASH is associated with obesity, diabetes mellitus type II, hyperlipidemia, rapid weight loss in individuals submitted to jejunioileal bypass surgery to treat obesity, and exposure to drugs and industrial toxins^(19,23). The recognition of its progressive potential and its high prevalence across the globe are the main reasons why the scientific community is interested in performing studies relating to the disorder⁽⁵¹⁾.

The histological evaluation of liver biopsy is the most refined method to distinguish steatohepatitis from simple steatosis, as well as to define steatosis severity and the different grades of inflammation and fibrosis in

* Study conducted at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Financial support: This study received financial support in the form of grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Conflict of interest: none.

¹ Post-Graduate Program of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ² Centro Universitário Metodista, IPA; ³ UFRGS; ⁴ Program in Rehabilitation and Inclusion, Centro Universitário Metodista, IPA; ⁵ Laboratory of Pathology and Bio-intervention, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – Salvador, BA, Brasil; ⁶ Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

Correspondence: Prof. Norma Possa Marroni - Rua José Narian Aranha, 102 - Jardim Isabel - 91760-470 - Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: nmarroni@terra.com.br

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

individuals with NASH⁽¹²⁾. It should be highlighted that few are the prospective studies using serial biopsies to evaluate the progress of the disease in patients with NASH^(5, 42).

Concerning treatment for NASH, so far no specific therapy has shown conclusive results and many authors think that patients with steatosis should be only observed and evaluated periodically. Others suggest that gradual weight loss and aerobic physical exercise could benefit obese patients, but further studies are necessary to confirm these hypotheses^(22, 41, 51).

There are few studies on drug treatment in humans⁽⁵¹⁾, and the great difficulty seems to be that the need for performing a second liver biopsy to evaluate treatment effectiveness is the main reason accounting for the small number of such studies, as this is the only truthful way of testing treatment efficacy.

In this sense, the development of experimental models characterizing the physiopathology of NASH, its complications and the use of appropriate treatment can aid in the understanding and explanation of the disease. In experimental studies one can control for genetic heterogeneity, gender differences, environmental factors, and lifestyle, since all animals used in the trials go through similar situations⁽³⁵⁾.

One determinant for the efficacy of using experimental studies in this disorder concerns the operational costs for each investigation and the time of disease induction. The choice of an experimental model that is effective and in keeping with the need to develop NASH may clarify the actual effect of drug therapy as well as the natural monitoring of the disease.

The use of a diet deficient in essential amino acids such as methionine and choline for inducing non-alcoholic steatohepatitis is a well-accepted model⁽¹²⁾. However, the costs and arrangements required to import such food hinder its use in developing countries like Brazil.

Thus, this study was designed to develop an experimental model of NASH using a diet deficient in methionine and choline based on Brazilian-made animal food, and to evaluate the liver alterations arising from the induced disorder.

METHODS

Animals

In this trial 30 male C57BL/6 mice were used. They were 8 weeks old and weighed 25 grams in average. They were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation of the University of Campinas (CEMIB-UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

The animals were kept in polypropylene cages (47x34x18cm), 10 animals in each cage and under standard conditions, with water and food ad libitum and 12h light/dark cycle (light cycle from 7 a.m. to 7 p.m.) and controlled temperature (24°C ± 1.0°C) and humidity (55% ± 5%) in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, RS, Brazil.

Diet composition

The methionine- and choline-deficient diet (MCD) was manufactured, under our request and guidance, by the

Brazilian company PragSoluções⁵, as described by Newberne and Camargo⁽⁴⁰⁾, with modifications.

Two types of rations were manufactured: MCD and control ration, which was identical to MCD but contained the adequate amounts of both amino acids.

Ration characteristics

The MCD and control rations developed by the Brazilian Co. PragSoluções Comércio e Serviços Ltda., according to our instructions were provided as 30 g cubes (2x2cm) that must be stored at 2-10°C for conservation because of the high content of lipids and saccharose. They are like caramel in color and have good smell and flavor, being well-accepted by the animals as food.

Experimental procedure

NASH was induced by providing the animals with the MCD ration ad libitum for 2 weeks. The animals in the control group received the same ration, however with the inclusion of methionine and choline in adequate concentrations.

The animals were randomly divided in two groups: control (CO): 15 mice which received the control ration (with the addition of methionine and choline) for 2 weeks; and NASH: 15 mice which received the MCD diet for 2 weeks.

One week prior to the beginning of the study, all animals started receiving the control ration so as to adapt to the new diet.

All experimental procedures were according to the norms established by the Health Research and Ethics Commission by the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA) (number process 09-050), as described in Guiding principles for research involving animals⁽⁴⁹⁾.

Experimental design and animal killing

On experimental day 1 the animals were randomly assigned to the groups and given their corresponding diets. The animals were weighed and monitored weekly during the experiment.

After 2 weeks the animals were weighed and anesthetized by inhalatory Isoflurane[®] so that their blood could be sampled from the retro-orbital plexus.

The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, followed by cervical dislocation as described in the AVMA guidelines on euthanasia⁽³⁾. The liver was removed by medium ventral laparotomy with total hepatectomy, a part of which was prepared for the histological analysis and the remaining tissue frozen in liquid nitrogen.

The livers were sectioned and a fraction of their lobes was used for histology, fixed in 10% formaldehyde solution for 24h and included in paraffin blocks for later staining. The remaining tissue was used for biochemical and oxidative stress analysis.

Histological analysis

For the microscopic analysis, the liver fragments slides were stained with hematoxylin-eosin (H-E) and picosirius and subsequently assessed by a single pathologist in blind fashion.

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

The minimum histological criterion for the diagnosis of NASH was the presence of steatosis associated with hepatocellular ballooning involving zone 3 and lobular inflammatory infiltrate⁽¹³⁾. Mallory bodies and sinusoidal fibrosis involving zone 3 could be present or not⁽²⁸⁾. The grading of both necro-inflammatory activity and fibrosis was according to the classification proposed by Brunt et al.⁽¹³⁾. The scoring system used for NASH classification was as recommended by the Pathology Committee of NASH Clinical Research Network⁽³¹⁾, semi-quantitatively classifying each case as steatosis (0-3), lobular inflammation (0-2), hepatocellular ballooning (0-2), and fibrosis (0-4).

In the picosirius red staining, the qualitative analysis was performed using a binocular microscope Nikon Labophot (Tokyo, Japan). The percentage of fibrosis in the liver tissue was determined by a histomorphometric analysis in microscope equipped with a digital camera and connected to an image capturing program (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). After analyzing 20 randomized fields per image, the ratios of conjunctive tissue relative to whole liver were calculated, the results appearing in pixels.

Liver integrity analysis

Liver integrity was assessed by measuring blood levels of enzymes aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP).

Biochemical analysis

The systemic biochemical analyses included glycemia, triglycerides, total cholesterol, high density lipoproteins (HDL), and very low density lipoproteins (VLDL).

Lipoperoxidation analysis

In the liver homogenate tissues, liver lipoperoxidation was evaluated using the method of thiobarbituric acid reactive substances, which detects the presence of malondialdehyde and other substances from lipid peroxidation of biological material. The results were expressed in micromol per milligram of protein ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)⁽¹⁶⁾. The technique consists in heating the homogenate with thiobarbituric acid and the consequent formation of a stained product, measured in spectrophotometer at 535 nanometers (nm).

Antioxidant enzymes analysis

SOD determination was based on the inhibition of the reaction of superoxide radical with adrenalin. SOD, present in the sample under study, competed for the superoxide radical through the system of detection. The results were expressed as units of SOD per mg of protein⁽³⁹⁾.

CAT enzyme activity was evaluated by determining, in spectrophotometer, the speed at which peroxide hydrogen H_2O_2 0.3M is broken down (with a wavelength of 240 nm). Enzyme activity was expressed in nmol per mg of protein⁽¹⁰⁾.

The activity of enzyme GSH consists in the formation of 2,4 dinitrophenyl-S-glutathione and was measured in spectrophotometer (Varian, Cary model) with wavelength of 340 nm. The results are expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein⁽⁹⁾.

Statistical analysis

The data appear as mean \pm standard error and were statistically submitted to the Student's *t*-test for independent samples, with a level of significance of 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Methionine and coline deficient diet

The diet MCD had good acceptance by the animals. Has a market value 55% smaller than the imported, with similar efficacy according to findings published in literature^(1, 2, 4, 8, 14, 15, 25, 32, 33, 34).

Morphological and histopathological analyses

All of the 30 mice submitted to the study completed the 2-week diet period. In the period of this study, do not have lost of animals due MCD diet.

The animals showed good acceptance of the MCD diet and we suggest previously using the control ration in the 1st week so that they can adapt to the new diet. The rodents were carefully observed because, owing to its less hard consistence, the MCD diet could induce overgrowth of the animals' fangs due to diminished attrition of the dentin⁽¹⁸⁾.

As shown in Table 1 and Figure 1, the animals' body weight in the NASH group was, in average, $6.93 \pm 0.18\text{g}$ lower than in the control group on the last day of the study, but such difference was not significant. The same was observed in the hepato-somatic index.

TABLE 1. Morphological evaluation and biochemical tests

	Control	NASH
Body weight (g)	26.69 \pm 0.51	19.76 \pm 0.69
Hepato somatic index (%)	4.66 \pm 0.12	3.59 \pm 0.33
Aspartate transaminase (AST)	110.60 \pm 16.96	449.00 \pm 41.52*
Alanine transaminase (ALT)	62.13 \pm 7.29	435.95 \pm 36.44*
Alkaline phosphatase (ALP)	93.38 \pm 2.87	106.19 \pm 2.71*
Glycemia	220.75 \pm 15.52	74.24 \pm 6.17*
Triglycerides	124.6 \pm 15.41	63.75 \pm 2.13*
Total cholesterol	122.91 \pm 5.93	57.33 \pm 2.49*
HDL	114.86 \pm 6.81	52.87 \pm 2.06*
VLDL	27.3 \pm 3.35	12.75 \pm 0.43*

*Statistically significant difference between the groups for Student's *t*-test for independent samples; $P < 0.05$; $n = 15$
NASH = non-alcoholic steatohepatitis.

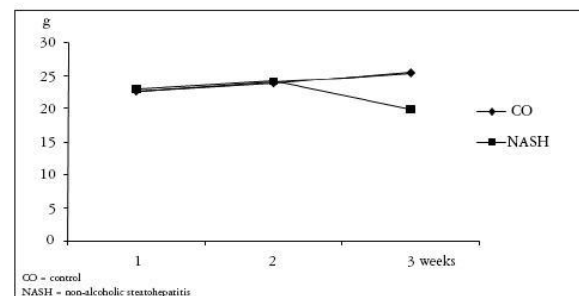


FIGURE 1. Variation in animal weight in 2 weeks (g)

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methione- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

Concerning histological findings, no animal receiving the CO ration presented histological alterations, all being considered with normal livers (Figures 2A and 2B).

Of the animals in the NASH group with the MCD diet (Table 2), all had microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis above grade 1, and hepatocellular ballooning. The inflammatory process showed mean grade of 2.22 ± 0.26 in the NASH group. The diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis was made in all of the animals of the NASH group (Figures 3A and 3B).

The degree of fibrosis as analyzed by picrosirius staining showed small quantity of fibrosis without statistical difference between the CO and NASH groups (18.26 ± 0.33 e 18.64 ± 0.59 pixels).

Biochemical and liver integrity analyses

The plasma levels of liver enzymes AST, ALT and FA were elevated with a statistically significant difference for the animals in the NASH group

The plasma levels of glycemia, triglycerides, total cholesterol, HDL and VLDL were reduced in the NASH as compared to the CO group, with statistically significant difference (Table 1).

Liperoxidation and liver antioxidant enzymes analysis

Thiobarbituric acid reactive substances results showed that the livers of animals in the NASH group had increased levels of liperoxidation as compared to CO animals (Table 3).

Superoxide dismutase and catalase activity of enzymes did not show any statistically significant differences across the groups, but total glutathione activity was significantly increased in the NASH group (Table 3).

DISCUSSION

The experimental diets facilitate the routine of researchers because they allow a fast delivery of results with the

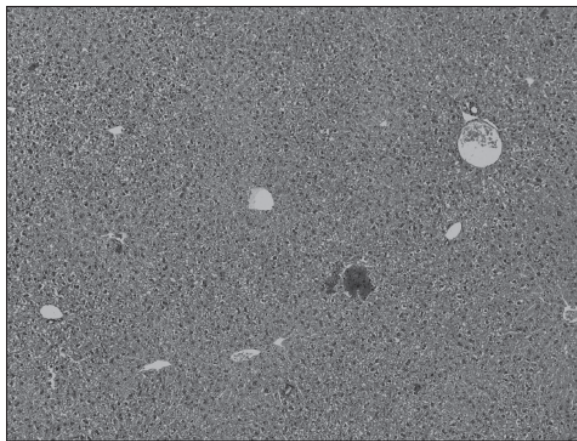


FIGURE 2A. Photomicrograph of liver in control animal. (H-E, 100x)

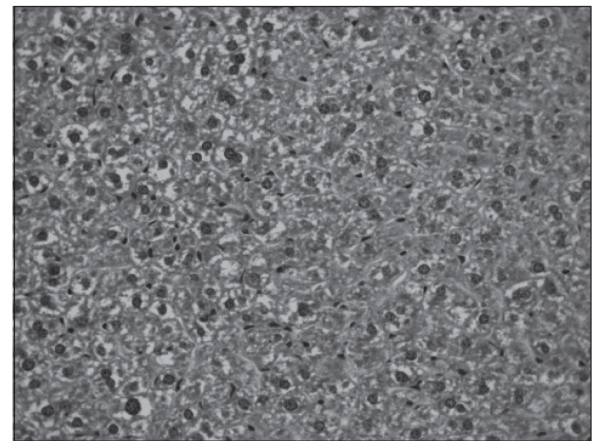


FIGURE 2B. Photomicrograph of liver in control animal. (H-E 400x).

TABLE 2. Scores in the histopathological analyses

Item	Definition	Score/Code	Control (n = 5)	NASH (n = 10)
Steatosis	<5%	0	0	$1.44 \pm 0.229^*$
	5%-33%	1		
	>33%-66%	2		
	>66%	3		
Microvesicular steatosis	Not Present	0	0	$0.67 \pm 0.211^*$
	Present	1		
Inflammation	None	0	0	$2.22 \pm 0.263^*$
	<2 foci per 200x field	1		
	2-4 foci per 200x field	2		
	>4 foci per 200x field	3		
Ballooning	None	0	0	$1.44 \pm 0.229^*$
	Few balloon cells	1		
	Many cells prominent ballooning	2		

*Statistically significant difference between the groups for Mann-Whitney test for independent samples; $P < 0.05$ NASH = non-alcoholic steatohepatitis

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

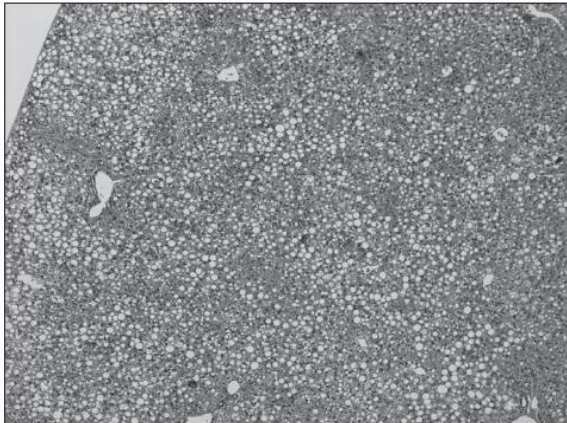


FIGURE 3A. Photomicrograph of liver in NASH animal showing macrovesicular steatosis and inflammatory activity (H-E 100x)

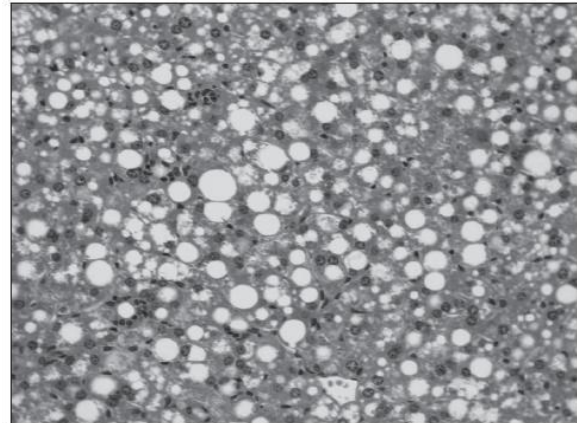


FIGURE 3B. Photomicrograph of liver in NASH animal showing macrovesicular steatosis, ballooning and inflammatory activity. (H-E 400x)

TABLE 3. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in liver

	Control	NASH
TBARS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	0.97 ± 0.06	$3.02 \pm 0.22^*$
SOD (1U SOD/mg of protein)	15.48 ± 2.47	21.64 ± 1.68
CAT ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	2.15 ± 0.58	2.37 ± 0.41
Total GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein)	0.02 ± 0.01	$0.13 \pm 0.03^*$

*Statistically significant difference between the groups for Student's *t*-test for independent samples; *P* < 0.05; n = 15 NASH - non-alcoholic steatohepatitis.

implementation of diseases for their studies. Because it allows a better understanding of the physiopathology and helps to clarify the mechanisms involved in the transition from steatosis to NASH so as to test the effectiveness of various available drugs for treatment⁽⁵¹⁾, the use of experimental models of NASH is of paramount importance.

The induction of NASH has been historically performed variously: by drug induction^(8,30,43); tetracycline, amiodarone, corticosteroids, etc; with the use of genetically obese rats or with genetic manipulation; and with the use of diets that promote its occurrence, either because they are high in fat or low in amino acids^(43, 48).

The use of the MCD diet is considered as the main model used for studying NASH⁽³⁵⁾. The diets deficient in methionine and choline are marketed in the form of pellets or cubes. They are mostly imported from first world countries such as the United States, something that makes research more difficult, time-consuming, and expensive. With the development of this Brazilian product, not only the costs were reduced by 45% but also the delivery time was significantly reduced as there were no customs procedures and related difficulties to go through.

The first characterization of steatohepatitis was the one developed by continual and excessive consumption of alcohol. Experimental and epidemiological studies have shown that chronic ingestion of ethanol causes depletion of such nutrients as choline, folate, and methionine due to the toxic interaction

of alcohol with their metabolism^(7,45). Accordingly, diets lacking methionine and choline were developed as a model of NASH induction in rodents producing the main characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in humans⁽²⁹⁾.

While the MCD diet is rich in saccharose (40%) and fat (10%), it lacks two crucial components, methionine and choline⁽³⁵⁾, the main precursors of NASH in this model. Choline is an essential amine that is part of the vitamin B complex. It is present in the cell membrane lipids and in the neurotransmitter acetylcholine. The recommended daily ingestion of choline is 425-550 mg for adults, and its sources include yolk, beans, soy and the like, soy lecithin, among others⁽⁵³⁾.

Choline is necessary for the synthesis of phospholipids of the cell membrane, methyl metabolism, cholinergic neurotransmission, transmembrane signaling, and transport and metabolism of lipid cholesterol⁽⁵⁴⁾.

The debate concerning the use of choline in the human diet centers around the metabolism of phosphatidyl-choline by phospholipases or de novo synthesis of choline⁽⁴⁴⁾. In the liver, biosynthesis of the choline portion occurs through methylation of phosphatidylethanolamine using S-adenosylmethionine as methyl donor⁽¹¹⁾.

This ability of de novo synthesis of choline means that the demand for choline can be partly met by methyl groups derived from carbon metabolism (via methyl folate and methionine). Due to this inter-relation of choline, methionine, folic acid, and B6 and B12 vitamins, it is believed that, even if nutrients are available in high enough quantities to sustain normal growth and function, the rates of de novo synthesis of choline are not sufficient to meet the essential demand of choline⁽⁵³⁾.

The accumulation of fat in the liver resulting from choline deficiency occurs because choline is required to make the phosphatidyl-choline portion in VLDL (very low density lipoprotein) particles^(24,46). In the absence of choline, VLDL

Marcolin E, Gorgiari LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

is not secreted and triacylglycerol (triglyceride) builds up in the liver cytosol. These quotes are in agreement with our data, where the plasma levels of triglycerides and cholesterol, in particular VLDL, are low (Table 1), but lipid accumulation in the liver is extensive (Figure 3A).

Rodents deficient in choline showed increased lipoperoxidation in liver⁽⁶⁾. Nuclear lipid peroxidation, as a great source of free radicals, is pointed as a DNA damager and inducer of carcinogenesis, along with dysfunction of programmed cell death (apoptosis)⁽³²⁾. In our experiments we found a significant increase in liver lipoperoxidation in the animals with NASH induced by two-week MCD diet.

The other component that is scarce in the MCD diet, methionine, is an essential amino acid that is converted to S-adenosylmethionine and used by methyl transferases which aggregate the methyl group to the DNA, RNA, proteins, and lipids and form S-adenosylhomocysteine that is hydrolyzed to homocysteine⁽³⁸⁾.

When methionine is present in excess, glycine n-methyltransferase and cystathione-β-synthase are activated by important regulatory pathways, using excess $-CH_3$ to convert glycine to n-methyl glycine and, then, condense homocysteine with serin to form cystathionin, which is cleaved by gamma cystathionases forming cysteine and α-ketobutirate. When methionine is low, the activities of both regulatory enzymes are decreased as homocysteine begins to be recycled to methionine, through methionine-synthase dependent cobalamin, which simultaneously converts $-CH_3$ -tetrahydrofolate to tetrahydrofolate⁽²⁶⁾.

Cysteine, formed by methionine, is the limiting reagent for glutathione (GSH) synthesis, the main cellular antioxidant. Therefore, two major homeostatic systems are interlinked and coordinately regulated by methionine metabolism, cellular methylation and the redox buffer system⁽³⁸⁾. As shown in our results, antioxidant enzymes SOD and CAT in the NASH group, which should be elevated as they detoxify the excess reactive oxygen species shown by lipoperoxidation, were not any different from the control group, showing the depletion of the scavenging ability of these enzymes. As this is about a 2-week model, we think the redox system is being maintained by GSH which, at this time, is still elevated in the NASH group (Table 3), as it is the last resource to fight off reactive oxygen species.

Deficiency of methionine and the other lipotropic factors (folate, B12, choline) are predictive of liver steatosis. Moreover, there is decreased formation of S-adenosylmethionine with decreased activation of folate, tRNA, creatine synthesis, lecithin, and norepinephrine⁽³⁷⁾.

Animals fed this diet (MCD) have significant loss of body weight (about 40% of baseline weight in 10 weeks)⁽⁴⁸⁾. The NASH animals in our experiment had a 25.96% decrease in their body weights in two weeks of treatment. Although the liver decreases in size, the liver/body weight ratio is unchanged^(27, 33, 48). This is in agreement with our findings.

The animals develop severe steatosis particularly in zone 3 (pericentral) and subsequent development of necroinflammation (especially in lymphocytes and polymorphonuclear neutrophils), and steatohepatitis in rodents fed the MCD diet leads to progressive fibrosis^(27, 33, 48). These reports are similar to the results obtained in our model (Figures 3A and 3B).

The MCD diet is extremely effective as an experimental model for the development and study of NASH. Studied since the mid 1940s⁽²¹⁾, this diet has been refined and used for inducing a form of NASH that is very similar to the human one, with implications of oxidative stress, elevated levels of TNFα, and increased lipid levels⁽³³⁾.

The present study demonstrated that the use of a methionine- and choline-deficient diet manufactured nationally is efficacious, cost-effective, easy to purchase (as there is no need to import it) and, especially, it does develop the characteristics of a form of NASH that is similar to the human one in only two weeks. Thus, the use of this experimental model is suggested for the study of this disorder and new potential forms of treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Research Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the staff at Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology of HCPA for their excellent scientific support. Student doctor Éder Marcolin, Dr. Alexandre Simões Dias and Dr. Juliana Tieppo were thanking Research Incentive supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). And special thanks for the Fundação Oswaldo Cruz – Bahia (FIOCRUZ).

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Dieta deficiente em metionina e colina induz mudanças hepáticas características de esteatohepatite não-alcóolica. *Arq Gastroenterol.* 2011;48(1)

RESUMO – Contexto - A esteatohepatite não-alcóolica é uma doença com alta incidência, difícil diagnóstico e tratamentos ainda não efetivos. Com isso, o uso de modelos experimentais para indução da esteatohepatite não-alcóolica e o estudo das rotas de desenvolvimento desta doença vem sendo empregado. **Objetivo** - Desenvolver um modelo experimental de esteatohepatite não-alcóolica a partir do uso de uma dieta deficiente de metionina e colina fabricada no Brasil e avaliar as alterações hepáticas decorrentes da doença. **Métodos** - Foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem C57BL6, onde a metade foi alimentada com dieta deficiente em metionina e colina desenvolvida no Brasil e o restante com dieta controle no período de duas semanas. Após, os animais foram mortos por exanguinação e foi realizada laparotomia com hepatectomia total e preparo do material para análise histológica, coleta de sangue para análises bioquímicas sistêmicas. O nível de significância foi 5%. **Resultados** - Os ratos que receberam a dieta deficiente em metionina e colina apresentaram perda de peso e aumento significativo das enzimas de integridade hepática e diminuição dos níveis bioquímicos sistêmicos de glicemia, triglicérides, colesterol total, HDL e VLDL. Todos os animais com esteatohepatite não-alcóolica mostraram, pelo menos, algum grau de esteatose macrovesicular. O diagnóstico de esteatohepatite não-alcóolica foi realizado em 100% dos camundongos que receberam a dieta deficiente em metionina e colina e nenhum dos animais que recebeu dieta controle apresentou alterações histológicas. Os animais com esteatohepatite não-alcóolica apresentaram aumento de lipoperoxidação e da enzima antioxidante GSH. **Conclusão** - A dieta deficiente de metionina e colina desenvolvida neste estudo apresenta índices elevados de indução de esteatose e esteatohepatite em modelo animal, apresentando comportamento patológico semelhante ao humano, com custo adequado e facilidade na sua aquisição.

DESCRIPTORES – Fígado gorduroso. Metionina. Deficiência de colina. Estresse oxidativo. Camundongos.

REFERENCES

- Albright CD, Liu R, Bethea TC, Da Costa KA, Salganik RI, Zeisel SH. Choline deficiency induces apoptosis in SV40-immortalized CWSV-1 rat hepatocytes in culture. *Faseb J.* 1996;10:510-6.
- Albright CD, Zeisel SH, Salganik RI. Choline deficiency induces apoptosis and decreases the number of eosinophilic preneoplastic foci in the liver of OXYS rats. *Pathobiology.* 1998;66:71-6.
- American Veterinary Medical Association - AVMA. AVMA guidelines on euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia) [Internet]. Schaumburg, IL, 2007. Available from: http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf
- Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res.* 2001;475:7-20.
- Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology.* 1994;107:1103-9.
- Banni S, Corongiu FP, Dessi MA, Iannone A, Lombardi B, Tomasi A, Vannini V. Free radicals and lipid peroxidation in liver of rats kept on a diet devoid of choline. *Free Radic Res Commun.* 1989;7:233-40.
- Barak AJ, Beckenhauer HC. The influence of ethanol on hepatic transmethylation. *Alcohol Alcohol.* 1988;23:73-7.
- Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology.* 1998;114:764-74.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134:707-16.
- Bremer J, Greenberg DM. Biosynthesis of choline in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1960;37:173-5.
- Brunt E. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2005;41:68-71.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2467-74.
- Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2005;41:68-71.
- Brunt EM, Tiniakos DG. Pathological features of NASH. *Front Biosci.* 2005;10:1475-84.
- Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hopenhede EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999;29:664-9.
- Carleton MD, Musser GG. Order Rodentia. In: Wilson DE, Reeder DM, editors. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference.* 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005. v.2, p.745-52.
- Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:27-41.
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;122:1649-57.
- Engel RW, Salmon WD. Improved diets for nutritional and pathologic studies of choline deficiency in rats. *J Nutr.* 1941;22:109-21.
- Eriksson S, Eriksson KF, Bondesson L. Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand.* 1986;220:83-8.
- Farrell GC. Drugs and steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2002;22:185-94.
- Fast DG, Vance DE. Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited: evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1258:159-68.
- Freitas L, Cotrim H. Atlas histológico de esteato-hepatite não alcoólica - NASH. Salvador: Zambon; 2006.
- Frontiera MS, Stabler SP, Kolhousea JF, Allen RH. Regulation of methionine metabolism: effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. *J Nutrition Biochem.* 1993;5:28-38.
- George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2003;39:756-64.
- Harrison S, Neuschwander-Tetri B. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004;8:861-79.
- Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2003;38:123-32.
- Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:8536-41.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41:1313-21.
- Koteish A, Diehl A. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis.* 2001;21:89-104.
- 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;105:1067-75.
- Leclercq IA. Pathogenesis of steatohepatitis: insights from the study of animal models. *Acta Gastroenterol Belg.* 2007;70:25-31.
- London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis.* 2007;11:55-74.
- Ludwig J, Viggiano T, McGill D, Oh B. Non-alcoholic steatohepatitis. *Mayo Clinic Proc.* 1980;55:434-8.

Marcolin E, Gorgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis

37. Maio R, Dichi JB, Burini RC. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arq Gastroenterol.* 2000;37:120-4.
38. Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataullakhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:89-96.
39. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170-5.
40. Newberne PM, Camargo JLVD, Clark AJ. Choline deficiency, partial hepatectomy and liver tumors in rats and mice. *Toxic Pathol.* 1982;10:95-106.
41. Palmer M, Schaffner F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology.* 1990;99:1408-13.
42. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology.* 1990;11:74-80.
43. Rogers A, Newberne P. Alcoholic and nutritional fatty liver and cirrhosis. *Am J Pathol* 1973;73:817-20.
44. Schann BD. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47:654-62.
45. Trimble KC, Molloy AM, Scott JM, Weir DG. The effect of ethanol on one-carbon metabolism: increased methionine catabolism and lipotrope methyl-group wastage. *Hepatology.* 1993;18:984-9.
46. Vance JE. Secretion of VLDL, but not HDL, by rat hepatocytes is inhibited by the ethanolamine analogue N-monomethylethanolamine. *J Lipid Res.* 1991;32:1971-82.
47. Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu SC, Mato JM, Martínez-Chantar ML. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease. *Int J Bichem Cell Biol.* 2009;41:969-76.
48. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology.* 1996;111:1645-53.
49. World Medical Association; American Physiological Society. Guiding principles for research involving animals and human beings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;283:R281-3.
50. Zamin I Jr, Mattos AA, Zettler CG. Non-alcoholic steatohepatitis in nondiabetic obese patients. *Can J Gastroenterol.* 2002;16:303-7.
51. Zamin I Jr, Mattos AA, Mattos AZ, Migon E, Soares E, Perry ML. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arq Gastroenterol.* 2009;46:69-74.
52. Zeisel SH, Albright CD, Shin OH, Mar MH, Salganik RI, da Costa KA. Choline deficiency selects for resistance to p53-independent apoptosis and causes tumorigenic transformation of rat hepatocytes. *Carcinogenesis.* 1997;18:731-8.
53. Zeisel SH. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition.* 2000;16:669-71.
54. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev.* 2009;67:615-23.

Received 28/5/2010.
Accepted 2/8/2010.

4.2 Experimento IIa

THE USE OF ANTIOXIDANT QUERCETIN IN PREVENTING LIVER DNA DAMAGE IN MICE WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

(Submetido à Digestive Diseases and Sciences sob o número DDAS10358)

Dear Mr. ÉDER MARCOLIN:

Thank you once again for the submission of your manuscript "The use of antioxidant Quercetin in Preventing Liver DNA Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis." to Digestive Diseases and Sciences. Your manuscript has been assigned to an editor and given the following manuscript number: DDAS10358.

During the review process, you can keep track of your manuscript's status by accessing the following website:

<http://dds.edmgr.com/>

Your username is: edermarcolin
Your password is: marcolin657233

If you have any questions, please do not hesitate to contact the journal's editorial office at dds.journal@gmail.com. Please remember to always include your manuscript number in all inquiries.

With kind regards,

Geetha Subramanian
Springer Journals Editorial Office



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

ACTION OF ANTIOXIDANT QUERCETIN PREVENTING DNA DAMAGE IN THE LIVER OF MICE WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

Authors:

Éder Marcollin, Luiz Felipe Forgiarini, Juliana Tieppo, Graziella Rodrigues, Greice Stefani Borghetti, Valquíria Linck Bassani, Jaqueline Picada, Norma Possa Marroni

**Date Issued:
March 19, 2012**

**Certificate Verification Key:
3954-6DBF-551F-3DC5-83EC**



This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and pricing, please visit www.journalexperts.com.

THE USE OF ANTIOXIDANT QUERCETIN IN PREVENTING LIVER DNA DAMAGE IN MICE WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

Éder Marcolin^a, Luiz Felipe Forgiarini^b, Juliana Tieppo^c, Graziella Rodrigues^d, Greice Stefani Borghetti^e, Valquiria Linck Bassani^e, Jaqueline Picada^f, Norma Possa Marroni^{a,b,c,g*}

^aPost-Graduate Program of Physiology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.

^bPost-Graduate Program in Pneumology Sciences – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.

^cHospital de Clínicas de Porto Alegre – Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental.

^d Post-Graduate Program of Medicine: Medical Sciences - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.

^ePost-Graduate Program of Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - Porto Alegre, Brasil.

^f Laboratório de Genética Toxicológica at the Universidade Luterana do Brasil.

^g Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes at the Universidade Luterana do Brasil.

*Correspondence and reprint request to Dra. Norma Possa Marroni

102, José Kanan Aranha

Porto Alegre, Rio Grande do Sul- Brazil

Tel: 55 51 3248-3202

e-mail: nmarroni@terra.com.br

Acknowledgements:

Supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA), and Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental (HCPA/UFRGS).

Abstract

Aim of the study: This study was designed to develop an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by using a diet deficient in methionine and choline (MCD); to assess liver alterations, oxidative stress parameters, lipoperoxidation, and DNA damage; and to evaluate the modulation that resulted from the use of the antioxidant flavonoid quercetin (Q). Methods: Male C57BL6 mice were divided into four groups (n=16): (i) Control plus Vehicle (control ration plus carboxymethylcellulose 1% used as vehicle, CO + V); (ii) Control ration plus Q 50 mg/kg (CO + Q); (iii) MCD diet plus vehicle (NASH + V); and (iv) MCD diet plus Q (NASH + Q). Diets were administered for 4 weeks. Results: The group NASH + Q showed a significant decrease in hepatic damage enzymes as well as decreased lipoperoxidation. NASH diagnosis was performed in 100% of the mice that were fed the MCD diet. The NASH plus Q group demonstrated a lower degree of macrovesicular steatosis, ballooning and inflammatory process. The comet assay revealed a significant increase in DNA damage in the NASH + V group, in comparison to CO + V. The NASH + Q group showed significantly lower DNA damage than NASH + V. Conclusion: The results of this animal NASH model demonstrate that 50 mg/kg of Q reduced levels of lipoperoxidation, DNA damage, and liver enzymes. These findings suggest that Q may have protective effects by improving liver integrity in NASH.

KEYWORDS: NASH, QUERCETIN, ANTIOXIDANT, COMET ASSAY

Abbreviations: Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH), deficient in methionine and choline (MCD), quercetin (Q)

Introduction

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is an increasingly recognized condition that may progress to end-stage liver disease [1,2]. Steatosis may progress to chronicity, but little is known regarding the relationship between steatosis and NASH. The theory of multiple hits, which is initiated by a metabolic disorder and followed by the activation of oxidative stress pathways as well as cytokines and stress of the endoplasmic reticulum, has been proposed to explain the pathogenesis of the disease [3-5].

An imbalance between pro-oxidants and antioxidants leads to oxidative stress, which causes oxidative damage of cellular macromolecules. Oxidative damage to mitochondria alters mitochondrial respiratory chain polypeptides and mitochondrial DNA to partially block the flow of electrons in the respiratory chain and increase mitochondrial reactive oxygen species (ROS) formation, leading to a vicious cycle of damage amplification [6]. ROS trigger lipid peroxidation, release of inflammatory cytokines, and cell death. Both biologically active lipid peroxidation products and cytokines act together to trigger the diverse hepatic lesions of NASH by inducing hepatic inflammation and fibrosis that lead eventually to end-stage liver disease [7].

Quercetin (Q) is a flavonoid aglycone present in large amounts in vegetables, fruits, tea and red wine. It represents one of the antioxidants of plant origin with the highest antioxidant potential, protecting cells against ROS [8-10]. Daily intake of Q is estimated at up to 25 mg/day in a normal human diet [11]. Its chemical structure [12] includes a phenolic hydroxyl, which imparts antioxidant properties with significant therapeutic potential against many diseases, including hepatic diseases, ischemic heart disease, atherosclerosis, cancer and kidney damage [13-17].

Thus, this study was designed to develop an experimental model of NASH using a diet deficient in methionine and choline based on Brazilian-made animal food [18]. The extent to

which this animal model of liver injury compared to human NASH was assessed by phenotypic, laboratory and histological parameters, oxidative stress parameters [19,20], lipoperoxidation, and DNA damage. The effects of the antioxidant flavonoid Q on NASH injury were then evaluated in this model.

Materials and methods

Animals

In this trial, 64 male C57BL/6 mice were used. They were 8 weeks old, weighed 25 grams on average, and were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation of the University of Campinas (CEMIB-UNICAMP), Campinas, São Paulo. The animals were kept in polypropylene cages (47x34x18 cm), 10 animals in each cage and under standard conditions. They were provided with water and food ad libitum and maintained on a 12 h light/dark cycle (light cycle from 7 a.m. to 7 p.m.) under controlled temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Diet composition

The methionine- and choline-deficient diet (MCD) was manufactured, under our request and guidance, by the Brazilian company PragSoluções[®], as described by Newberne & Camargo (1982) [21] with modifications by Marcolin et al (2011)[18]. Two types of rations were manufactured: MCD and control. The control ration was identical to MCD but contained adequate amounts of methionine and choline.

Experimental procedure

NASH was induced by placing the animals on the MCD diet ad libitum for four weeks. The animals in the control group received the same ration, though with the addition of adequate concentrations of methionine and choline.

The animals were randomly divided into four groups: Control + Vehicle (CO + V): 16 mice received the control ration (with the addition of methionine and choline) for 4 weeks plus vehicle; Control + quercetin (CO + Q): 16 mice received the control ration for 4 weeks plus quercetin 50 mg/kg; NASH plus vehicle (NASH+V): 16 mice received the MCD diet for 4 weeks plus vehicle; and NASH plus quercetin (NASH + Q): 16 mice received the MCD diet for 4 weeks plus quercetin 50 mg/kg. The vehicle was composed of sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) 1% and functioned as a carrier for Q. The flavonoid Q ($C_{15}H_{10}O_7$) (CAS Registry Number 117-39-5) (50 mg/kg) was purchased from Sigma Chemical CO., USA. One week prior to the beginning of the study, all animals started receiving the control ration to adapt to the new diet.

All experimental procedures were according to the norms established by the Health Research and Ethics Commission by the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), as described in Principles for Research Involving Animals (NAS) [22] under protocol number 09-050.

Experimental design

On experimental day 1, the animals were randomly assigned to the groups and given their corresponding diets. The animals were monitored during the experiment. After 4 weeks, the animals were weighed and anesthetized by inhalatory Isoflurane® so that their blood could be sampled from the retro-orbital plexus for liver integrity and biochemical analysis. The animals were killed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, followed by cervical dislocation as described in the AVMA Guidelines on Euthanasia [23]. The liver was removed by medium ventral laparotomy with total hepatectomy, a part of which was prepared for the histological analysis while the remaining tissue was frozen in liquid nitrogen for oxidative stress analysis. The remaining tissue was used for DNA analysis. The livers were sectioned, and a fraction of their lobes was used for histology, fixed in 10% formaldehyde solution for 24 h and processed into paraffin blocks for later staining.

Histological analysis

For the microscopic analysis, the liver fragment slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and subsequently assessed by a single pathologist blinded to the experimental groups. The minimum histological criterion for the diagnosis of NASH was the presence of steatosis associated with hepatocellular ballooning involving zone 3 and lobular inflammatory infiltrate [24]. Mallory bodies and sinusoidal fibrosis involving zone 3 could be present or not [25]. The grading of both necro-inflammatory activity and fibrosis was performed according to the classification proposed by Brunt et al. [24]. The scoring system recommended by the Pathology Committee of NASH Clinical Research Network [26] was used for NASH

classification, which semi-quantitatively classifies each case as steatosis (0-3), lobular inflammation (0-2), hepatocellular ballooning (0-2), and fibrosis (0-4).

In the HE staining, the qualitative analysis was performed using a binocular microscope Nikon Labophot (Tokyo, Japan). The percentage of fibrosis in the liver tissue was determined by histomorphometric analysis using a microscope equipped with a digital camera and connected to an image-capturing program (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). After analyzing twenty randomized fields per image, the ratios of conjunctive tissue relative to whole liver were calculated with the results appearing in pixels.

Liver integrity analysis

Liver integrity was assessed by measuring blood levels of enzymes aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP).

Biochemical analysis

The systemic biochemical analysis included high-density lipoproteins (HDL), total cholesterol, glycemia and triglycerides.

Lipoperoxidation analysis

In the liver homogenate tissues, liver lipoperoxidation was evaluated using the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which detects the presence of malondialdehyde (MDA) and other substances from lipid peroxidation of biological material. The results are expressed in nanomol per milligram of protein (nmol/mg prot) [27]. The

technique consisted of heating the homogenate with thiobarbituric acid and measuring the subsequent formation of a stained product using a spectrophotometer at 535 nanometers (nm).

Antioxidant enzymes analysis

Superoxide dismutase (SOD) determination was based on the inhibition of the reaction between superoxide radicals and adrenaline. SOD, present in the sample under study, competed for the superoxide radical through the system of detection. The results were expressed as units of SOD per mg of protein [28]. Catalase (CAT) enzyme activity was evaluated by determining, in a spectrophotometer, the speed at which peroxide hydrogen (H_2O_2 0.3 M) was broken down (at a wavelength of 240 nm). Enzyme activity was expressed in nmol per mg of protein [29].

Comet assay

The alkaline comet assay was carried out as described in Tice *et al.* (2000) [30], with minor modifications [31]. The liver tissue samples (200-250 mg) were placed in 0.5 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS) and finely minced to obtain a cell suspension. Liver cell suspensions (5 μL) were embedded in 95 μL of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for 48 h at 4 °C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH >13) for 20 min at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to perform DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH

7.5), stained with silver and analyzed using a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal and consequently for each studied group. Therefore, the damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells X 0) to 400 (with maximum damage, 100 cells X 4). Damage frequency (%) was calculated based on the number of tailed versus tailless cells.

Statistical analysis

The data were analyzed using a Student Newman Keuls post-hoc ANOVA test. The statistical evaluation of data obtained in the comet assay was carried out using Tukey's test. The histological scores were statistically evaluated using the Kruskal-Wallis test for independent samples. In all comparisons, a p-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Morphological and histopathological analyses

All the mice submitted to the study completed the 4-week diet period. No animals were lost due to the MCD diet. The animals showed good acceptance of the MCD diet; therefore, we suggest using the control ration prior to the first week to allow the animals to adapt to the new diet.

With regards to histological findings, no animal receiving the CO ration demonstrated any histological alterations. All animals were considered to have normal livers (Figure 1 and Table 1).

The animals in the NASH group with the MCD diet of 4 weeks had microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis above grade 1, and hepatocellular ballooning (Figure 1 and Table 1). The inflammatory process showed a mean grade of 2.30 ± 0.213 in the NASH group. The diagnosis of NASH was made in all of the animals of the NASH group (Table 1). Reduced scores of microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis, ballooning and inflammatory process were observed in the animals treated with Q for 4 weeks (Table 1 and Figure 1).

Liver integrity and biochemical analyses

The plasma levels of the liver enzymes AST and ALT were elevated in the NASH group (Figure 2), and significant improvements were observed in the groups treated with Q after 4 weeks. The plasma levels of glycemia, triglycerides, total cholesterol, and HDL were significantly reduced in the NASH group compared to the CO group (Figure 3), although no significant differences were observed between the NASH groups and the treated group.

Lipoperoxidation and liver antioxidant enzymes analysis

The TBARS results showed that the livers of the animals in the NASH group had increased levels of lipoperoxidation compared to the CO animals. Statistically significant differences were observed between the NASH + V and NASH + Q groups after 4 weeks

(Figure 4). The SOD and CAT activity of enzymes did not show any statistically significant differences across the groups (Figure 5 and Figure 6).

Comet assay

Table 2 shows the DNA damage in livers after treatment for 4 weeks. Following treatment, there was a significant increase in both parameters measuring DNA damage (DI and DF; $p \leq 0.01$) in liver of the NASH+V group compared to the CO + V group. The NASH + Q group showed significantly lower DI than the NASH + V group ($p \leq 0.05$), although the value remained above that found in the CO + V group.

Discussion

Experimental diets represent a useful tool in research because they deliver quick results for the study of disease progression. Because they allow a better understanding of the physiopathology and mechanisms involved in the transition from steatosis to NASH [32,33], experimental models of NASH are of paramount importance in testing the effectiveness of various available drugs for treatment.

The MCD diet is considered the main model used in the induction of NASH [34]. Increases in aminotransferase levels lead to focal inflammation, hepatic necrosis and fibrosis without developing resistance to insulin [19].

This diet produces steatosis due to a reduction in the export of VLDL and a decrease in choline and methionine, which are the precursors of phosphatidylcholine, the phospholipid lining the VLDL [35,36]. In the absence of choline, VLDL is not secreted and triacylglycerol (triglyceride) builds up in the liver cytosol. These VLDL fragments are supported by our data,

which demonstrated a decrease in plasma levels of triglycerides and cholesterol (Figure 3) along with extensive lipid accumulation in the liver (Figure 1).

Several studies have shown that ROS are increased in NASH [37-41], while the levels of antioxidants (vitamin E and glutathione) tend to be reduced [42]. Studies show a reduction in hepatic steatosis and oxidative stress with the administration of vitamin C or S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) in rats fed a diet deficient in choline and methionine [43,44]. The purpose of the present study was to evaluate the effects of Q on the inhibition of steatohepatitis diet-induced MCD in mice as well as to assess the action of this antioxidant on hepatic oxidative stress and hepatocellular injury. It was observed that Q inhibited the development of NASH by reducing macrovesicular steatosis, microvesicular steatosis, hepatocellular ballooning and inflammatory infiltrate (Table 1 and Figure 1). This effect was accompanied by a significant reduction in lipid peroxidation (Figure 4) and inflammation (Table 1 and Figure 1).

Rodents deficient in choline showed increased lipoperoxidation in the liver [45]. Nuclear lipid peroxidation, as a great source of free radicals, is cited as an inducer of DNA damage and carcinogenesis, along with dysfunction of programmed cell death (apoptosis) [46]. In previous experiments, we found a significant increase in liver lipoperoxidation in animals with NASH induced by a two-week MCD diet [18].

Because NASH has a fundamental connection to the process of oxidative stress, the study of antioxidants in preventing or treating this disease becomes important. A number of beneficial effects of Q on human health have been shown, and some studies [47,48] have indicated an important role for Q in fighting the deleterious effects of ROS and inhibiting redox-sensitive signaling pathways [9].

The antioxidant properties of Q have been investigated [49] quite extensively, and there is evidence that they involve direct [50] scavenging of radicals as well as indirect

activation of 344 transcription factors (e.g., Nrf2) that regulate the expression of genes encoding for antioxidant enzymes [51]. This finding is in agreement with the induction of CAT and SOD [52]. In our study, we observed a decrease in the enzyme catalase, although not statistically significant, in the NASH groups; this can be explained by an attempt to reduce ROS generated by the systemic consumption of CAT (Figure 6).

In this model, Q was not able to induce genotoxicity evaluated by the comet assay because DI and DF values were similar in both control groups. In fact, higher Q concentrations produced a genotoxic effect [53]. However, Q is a flavonoid known for its ability to give a hydrogen atom to free radicals, thus neutralizing cations capable of producing a hydroxyl radical [54]. This flavonoid can also modulate a wide range of mammalian enzyme activities, such as cytochrome P450 and several antioxidant enzymes [55]. Thus, the antioxidant properties of Q should decrease damage in liver of NASH mice.

In addition to leading to lipoperoxidation, ROS may induce oxidation of DNA and protein [30]. Oxidative DNA damage is the most common threat to genomic stability. There is strong evidence implicating the generation of ROS and the corresponding responses to oxidative stress as key factors in the pathogenesis of several human diseases. NASH mice exhibited increased DNA damage (Table 2) compared with control mice, suggesting that this disorder can decrease genomic stability in the liver. In the alkaline version used in this study, the comet assay detected a broad spectrum of DNA lesions, including single strand breaks, which are increased by the presence of ROS [30,56]. In this study, a significant increase in DNA damage in the target-tissue liver (Table 2) was observed in the NASH group. Most likely, these effects were induced by ROS, which are implicated in the pathogenesis of NASH [57].

However, the DNA damage observed in the NASH + Q group was lower than in the NASH + V group, suggesting protective effects by the Q-treatment of NASH mice (Table 2).

Other studies using the comet assay have shown the protective role of Q as a scavenger of ROS by decreasing DNA strand breaks and oxidized bases [58]. After treatment for 4 weeks, there was an increase in DNA damage in the NASH + V group in comparison to the control group, suggesting a progression of liver injury. Additionally, it should be noted that Q was not able to decrease DNA damage to the point of reaching similar DI values in comparison to the control group, most likely due to the severity of liver damage, as confirmed by the histopathological findings (Figure 1).

Conclusion

Overall, Q (50 mg/kg) reduced levels of lipoperoxidation and DNA damage in the liver as well as the levels of liver enzymes in animals with NASH. These findings suggest that the protective effects of Q are mediated by improving liver integrity.

References

- [1] Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52:59-69.
- [2] Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 1297-305.
- [3] Day C. NASH-related liver failure: one hit too many? *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 2058-62.
- [4] Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2002;16:663-678.

- [5] Day CP. Mechanisms of Steatosis: Is steatosis still the first hit? EASL; Progamms and Abstracts EASL special conference - NAFLD/NASH and related metabolic diseases. 2009; 63-64.
- [6] Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002; 282:G193-G199.
- [7] Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol.* 2005; 42:928-40.
- [8] Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol.* 2000; 33:742-50.
- [9] Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:1939-46.
- [10] Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45:1140-6.
- [11] Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, et al. Neuroprotection by flavonoids. Brazilian journal of medical and biological research. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 36: 1613-1620.
- [12] Chobot V. Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 2088-2094.
- [13] Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33: 1061-1080.
- [14] Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Archives of medical research.* 2004; 35: 484-494.

- [15] Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM. et al. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 2092-2100.
- [16] Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Çakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta chir belg.* 2006; 106: 68-72.
- [17] Erdman J.W, Jr., Balentine D, Arab L, et al. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC1–4, *J Nutr.* 2007; 137: 718S-737S.
- [18] Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA, Marroni NP. Methionine- and Choline-Deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol.* 2011; 48: 72-79.
- [19] Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008; 49:1068-76.
- [20] Pelz S, Stock P, Bruckner S, Christ B. A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation. *Exp Cell Res* 2012; 318:276-87.
- [21] Physiol AJ. Guiding principles for research involving animals and human beings. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 83: R281-R283.
- [22] Newbere PM, Camargo JLVD, Clark AJ. Choline Deficiency, Partial Hepatectomy and Liver Tumors in Rats and Mice. *Toxicologic pathology.* 1982; 10: 95-106.
- [23] Association AVM. AVMA Guidelines on Euthanasia - Formerly Report of the AVNA. AVNA Panel on Euthanasia. 2007.
- [24] Brunt E, Janney C, Bisceglie AD et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94: 2467-2474.

- [25] Harrison S, Neuschwander–Tetri B. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2004; 8: 861-879.
- [26] Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2005; 41, 1313-1321.
- [27] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-309.
- [28] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *World J Biol. Chem*. 1972; 247: 3170-3175.
- [29] Boveris A. Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973; 134: 707-716.
- [30] Tice RR, Agurell E, Anderson D et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000; 235: 206-221.
- [31] Kaefer V, Semedo JG, Silva Kahl VF. DNA damage in brain cells and behavioral deficits in mice after treatment with high doses of amantadine. *J Appl Toxicol*. 2010; 30: 745-53.
- [32] Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:1-16.
- [33] Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23:1635-1648.
- [34] London RM, George J. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clin Liver Dis*. 2007; 11: 55-74.
- [35] Vance JE. Secretion of VLDL, but not HDL, by rat hepatocytes is inhibited by the ethanolamine analogue N-monomethylethanolamine. *J Lipid Res*. 1991; 32: 1971-1982.
- [36] Fast DG, Vance DE. Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited: evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1258: 159-168.

- [37] Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2005; 33:68-71.
- [38] Caldwell SH, Chang CY, Nakamoto RK, Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis.* 2004;8:595-617.
- [39] Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva Rde C, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol.* 2011; 10: 33-7.
- [40] Day C. From fat to inflammation. *Gastroenterology.* 2006;130:207-210.
- [41] Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK, Jr., Bastos Mdo S, Matsuda M, Della Nina BI, Yahnosi K, Abdala DS, Vezozzo DC, Alves VA, Zilberstein B, Garrido AB, Jr., Halpern A, Carrilho FJ, Gama-Rodrigues JJ. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) -- preliminary findings. *Obes Surg.* 2005;15:502-5.
- [42] Chitturi S, Farrel G. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21: 89-104.
- [43] de Oliveira CP, Stefano JT, de Lima VM. Hepatic gene expression profile associated with non-alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine in ob/ob mice. *J Hepatol.* 2006; 45: 725-33.
- [44] de Lima VM, de Oliveira CP, Sawada LY. et al. Yo jyo hen shi ko, a novel Chinese herbal, prevents nonalcoholic steatohepatitis in ob/ob mice fed a high fat or methionine-choline-deficient diet. *Liver Int.* 2007; 27: 227-34.
- [45] Banni S, Corongiu FP, Dessi MA et al. Free radicals and lipid peroxidation in liver of rats kept on a diet devoid of choline. *Free Radic Res Commun.* 1989; 7; 233-240.
- [46] Zeisel SH, Albright CD, Shin OH, Mar MH, Salganik RI, da Costa KA. Choline deficiency selects for resistance to p53-independent apoptosis and causes tumorigenic transformation of rat hepatocytes. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 731-738.

- [47] Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585: 325-337.
- [48] Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. (2009) Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr.* 2009; 139: 1339-1346.
- [49] Kim GN, Jang HD. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171; 530-537.
- [50] Farombi EO, Fakoya A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res.* 2005; 49; 1120-1128.
- [51] Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, et al. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49: 738-47.
- [52] Barcelos GR, Angeli JP, Serpeloni JM, et al. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. *Mutat Res.* 2011; 726:109-15.
- [53] Silva J, Herrmann SM, Peres W, Marroni NP, González-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 941-947.
- [54] Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. C.A. Rice-Evans, L. Packer, Editors, *Flavonoids in health and disease*, Marcel-Dekker Inc, New York, 1998; 137-161.

[55] Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 2001; 475: 89-111.

[56] Hartmann A, Agurell E, Beevers C. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2003; 18: 45-51.

[57] Schults MA, Nagle PW, Rensen SS, Godschalk RW, Munnia A, Peluso M, Claessen SM, Greve JW, Driessen A, Verdam FJ, Buurman WA, van Schooten FJ, Chiu RK. Decreased nucleotide excision repair in steatotic livers associates with myeloperoxidase-immunoreactivity. *Mutat Res.* In press.

[58] Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2005; 582; 155-162.

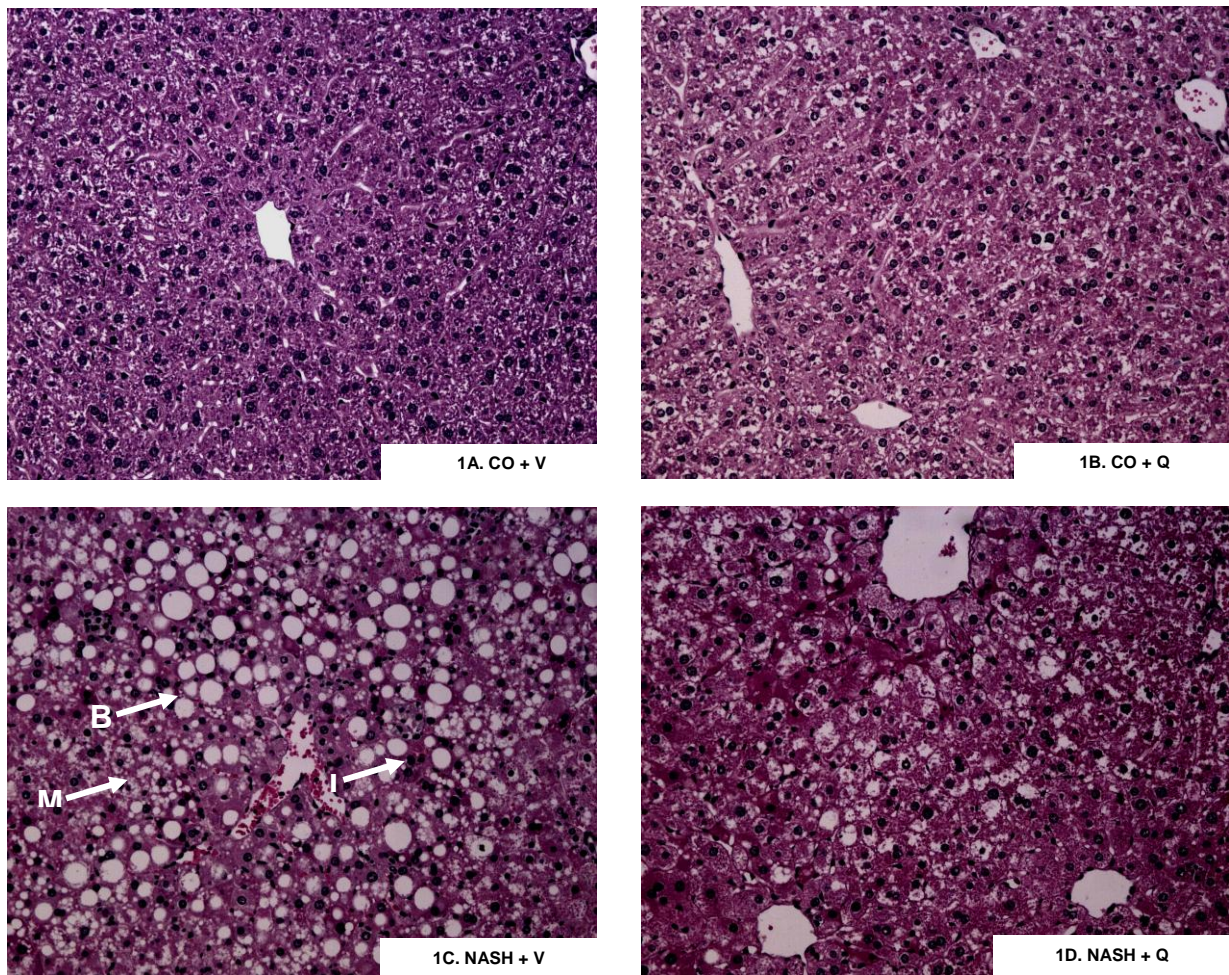


FIGURE 1

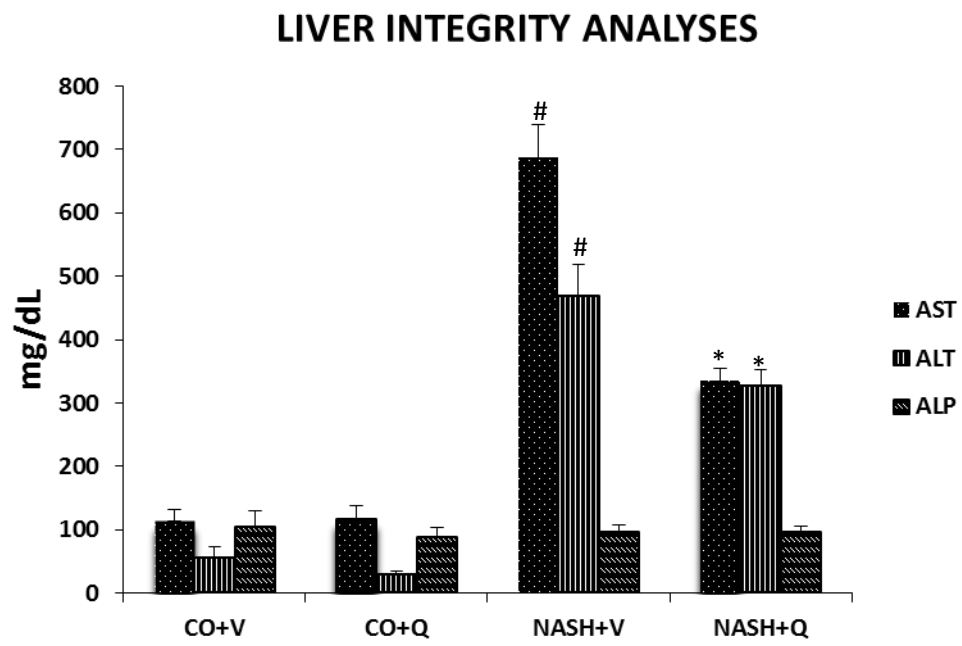
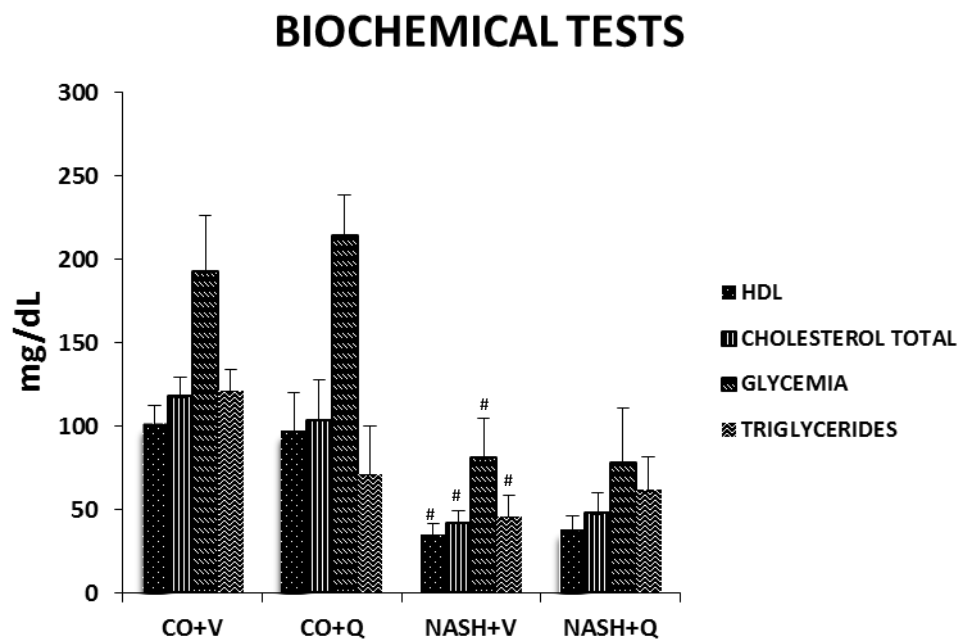
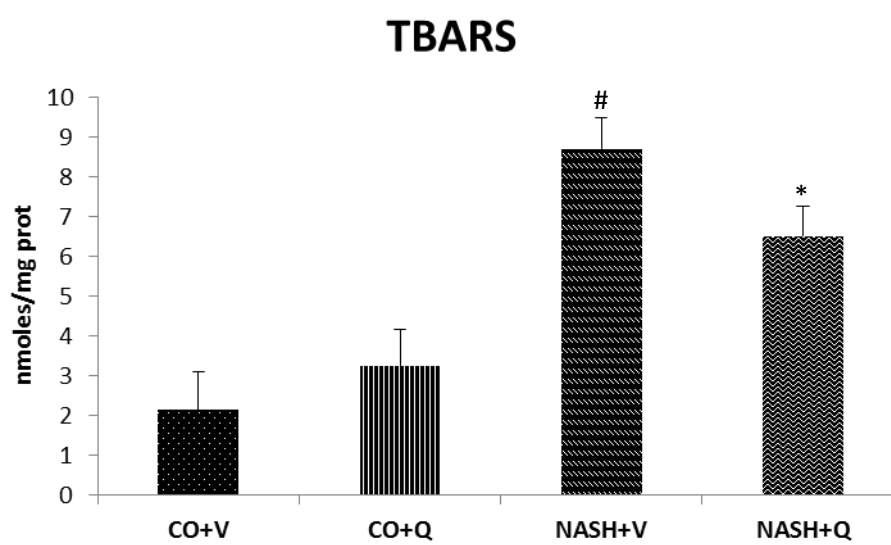
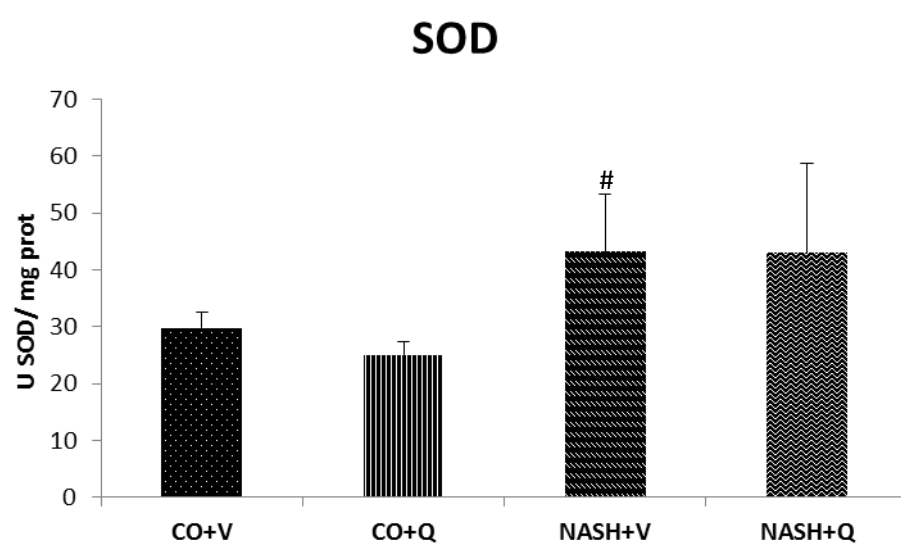


FIGURE 2

**FIGURE 3**

**FIGURE 4**

**FIGURE 5**

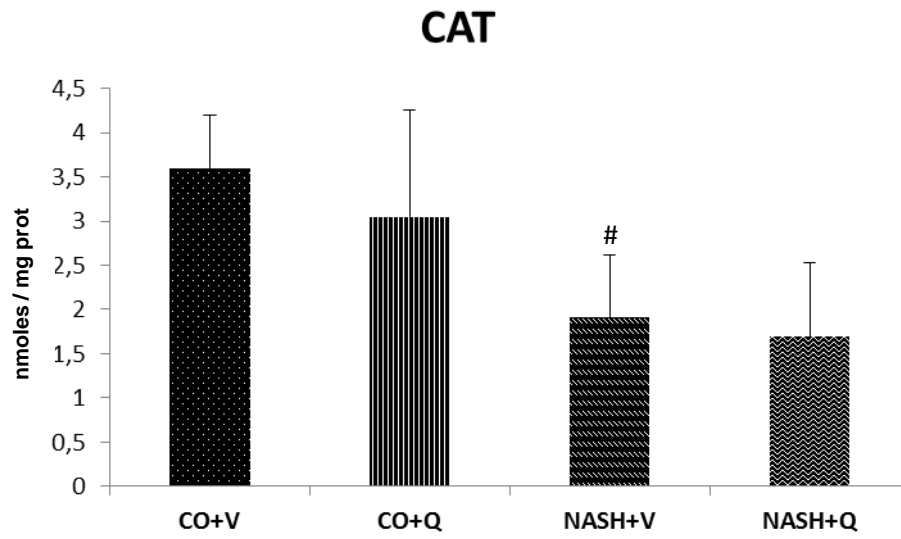
**FIGURE 6**

TABLE 1

Item	Definition	Score	CO + V (n=5)	CO + Q (n=5)	NASH + V (n=10)	NASH + Q (n=10)
Steatosis	<5%	0				
	5% - 33%	1				
	>33% - 66%	2	0	0	2.60±0.163	1.06±0.202*
	>66%	3				
Microvesicular Steatosis	Not Present	0				
	Present	1	0	0	0.90±0.099	0.33±0.153*
Inflammation	None	0				
	<2 foci per 200x field	1				
	2-4 foci per 200x field	2	0	0	2.30±0.213	0.78±0.204*
	>4 foci per 200x field	3				
Ballooning	None	0				
	Few balloon cells	1				
	Many cells	2	0	0	1.70±0.152	0.61±0.192*
	Prominent ballooning					

TABLE 2

	<i>CO + V</i>	<i>CO + Q</i>	<i>NASH + V</i>	<i>NASH + Q</i>
Dla	53.8 ± 19.9 ^{###}	55.6 ± 19.7 ^{###}	215.8 ± 11.9 ^{***}	189.1 ± 18.2 ^{*** #}
DFb	26.4 ± 5.7 ^{###}	35.8 ± 6.8 ^{###}	79.7 ± 5.7 ^{***}	77.9 ± 5.1 ^{***}

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Effects of the administration quercetin in mice with NASH. Photomicrograph of liver of CO + V, CO + Q, NASH + V and NASH + Q animals. (H-E, 100x). The arrows in images 1C and 1D show the microvesicular steatosis (M), ballooning (B) and inflammation (I).

FIGURE 2: Effects of the administration quercetin on liver integrity in mice with NASH. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). #Statistically significant difference between the CO + V, CO + Q and NASH + V groups $p < 0.05$. *Statistically significant difference between the NASH + V and NASH + Q groups $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

FIGURE 3: Effects of the administration quercetin on biochemical tests in mice with NASH. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). #Statistically significant difference between the CO + V, CO + Q and NASH + V groups $p < 0.05$. *Statistically significant difference between the NASH + V and NASH + Q groups $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

FIGURE 4: Effects of the administration quercetin on lipoperoxidation in mice with NASH. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). #Statistically significant difference between the CO + V, CO + Q and NASH + V groups $p < 0.05$. *Statistically significant difference between the NASH + V and NASH + Q groups $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

FIGURE 5: Effects of administration quercetin on the activity antioxidants enzyme SOD in mice with NASH. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). #Statistically significant difference between the CO + V, CO + Q and NASH + V groups $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

FIGURE 6: Effects of administration quercetin on the activity antioxidants enzyme CAT in mice with NASH. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). #Statistically significant difference between the CO + V, CO + Q and NASH + V groups $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

TABLES LEGENDS

TABLE 1. Histopathological analyses scores of the animals after the 4-week treatment. *Statistically significant difference between the groups using the Kruskal-Wallis test for independent samples; $p < 0.05$. CO + V: Control plus Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin

TABLE 2. Comet assay in the liver from mice with and without NASH with quercetin. Histopathological analyses scores of the animals after the 4-week treatment. $n = 5$ animals per group. aDI: Damage index, which can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage 100 x 4); bDF (%): Damage frequency, which was calculated based on the number of cells with a tail versus those with no tail. Significant difference from the vehicle control (CO + V) group: *** $p \leq 0.01$. Significant difference from the NASH + V group: # $p \leq 0.05$, ### $p \leq 0.01$. CO + V: Control + Vehicle; CO + Q: Control plus quercetin; NASH + V: NASH plus vehicle; NASH + Q: NASH plus quercetin.

4.3 Experimento IIb

QUERCETIN MODULATES THE PROGRESSION OF INFLAMMATORY PARAMETERS AND LIVER FIBROSIS IN MICE WITH NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS.

(A ser submetido a *Liver International Journal*, ISSN 1478-3223)



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Quercetin enhances the progression of inflammatory parameters and liver fibrosis in mice with non-alcoholic steatohepatitis

Authors:

Éder Marcolin, Juliana Tieppo, María Jesus Tuñon, Norma Possa Marroni

Date Issued:

March 20, 2012

Certificate Verification Key:

24F5-0222-BB76-5FBC-FFCE



This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.journalexperts.com.

**QUERCETIN MODULATES THE PROGRESSION OF INFLAMMATORY
PARAMETERS AND LIVER FIBROSIS IN MICE WITH NON-ALCOHOLIC
STEATOHEPATITIS**

Éder Marcolin^{†□}, Juliana Tieppo^{†□}, María Jesus Tuñon^π and Norma Possa Marroni^{□¶π}

[†]*Physiotherapist and Doctoral Student in the Post-Graduate Program of Physiology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.*

[†]*Physiotherapist and Doctor in Physiology at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.*

[□]*Researcher in the Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA and the Laboratory of Oxidative Stress at the Universidade Luterana do Brasil – ULBRA.*

[¶]*Professor of Post-Graduate Program of Physiology and professor of Post-Graduate Program of Medical Clinic at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, Brazil.*

^π*Institute of Biomedicine (IBIOMED), University of León, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Spain.*

Correspondence and reprint request to Dr. Norma Possa Marroni

102, José Kanan Aranha

Porto Alegre, Rio Grande do Sul- Brazil

Tel: 55 51 3248-3202

e-mail: nmarroni@terra.com.br

ABSTRACT:

Introduction: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a common, often silent liver disease with a high incidence, difficult diagnosis, and no effective therapies. The major feature of NASH is fat in the liver, along with liver inflammation and damage. **Aim:** This study was designed to use an experimental model of NASH based on a diet deficient in methionine and choline (MCD) to assess liver alterations and the molecular parameters of inflammatory and fibrosis and to evaluate the response to the antioxidant flavonoid quercetin (Q). **Methods:** Male C57BL/6 mice divided were into four groups (n=8): (i) control+vehicle (control ration plus carboxymethylcellulose 1% used as vehicle, CO+V); (ii) control ration plus 50 mg/kg of quercetin (CO+Q); (iii) MCD diet plus vehicle (NASH+V); and (iv) MCD diet plus Q (NASH+Q). The diets were administered for 4 weeks. We evaluated the hepatic levels of enzymes that are required for hepatic function (AST, ALT and ALP). We also investigated the mRNA expression of TNF- α , HMGB-1, COX-2, CTGF, TGF- β , MMP-9 and AREG by RT-PCR and the protein expression of TLR-4, JNK and pJNK by Western blotting. **Results:** The NASH+Q group showed a significant decrease in the levels of enzymes associated with hepatic damage, as well as a reduction of inflammation based on the expression of TNF- α , HMGB1, TLR-4, COX-2 and JNK and a reduction in fibrosis based on the expression of CTGF, TGF- β , MMP-9 and AREG in the liver. The NASH diagnosis was confirmed in 100% of the mice that were fed the MCD diet, and a lower degree of macrovesicular steatosis, ballooning and inflammation was observed in the NASH+Q group. **Conclusion:** The results demonstrate that 50 mg/kg Q reduced the levels of enzymes associated with hepatic damage, as well the levels of inflammation and fibrosis in the liver, suggesting protective effects of the liver in this model.

KEYWORDS: NASH, QUERCETIN, INFLAMMATION, FIBROSIS

INTRODUCTION:

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is recognized as the most important liver disease in Western societies¹. The spectrum of this disease ranges from simple steatosis to steatohepatitis, liver fibrosis, cirrhosis and eventually hepatocellular carcinoma. In turn, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the most important form of NAFLD, is characterized by fat accumulation in the hepatic tissue associated with various degrees of inflammation and progressive fibrosis².

Day and James³ proposed the “two-hit hypothesis” to explain the development of hepatic steatosis and the progression to inflammation (NASH), fibrosis, and cirrhosis. The hypothesis claimed that factors such as insulin resistance and impaired hepatic fatty acid oxidation contribute to NASH development⁴ and that once steatosis is present, inflammation and oxidative stress are thought to activate stellate cells and increase collagen deposition and fibrogenesis⁵. The first hit is steatosis itself, increasing the sensitivity of the liver to second hits, which then cause liver injury⁶ characterized by tissue lesions, inflammation and fibrosis. The triggers of the second hit may include oxidative, cytokine-mediated or endoplasmatic reticulum (ER)-based stress⁷.

NASH development is associated with the activation of hepatic stellate cells and a pro-inflammatory response from Kupffer cells, contributing to the inflammatory process and the development of fibrosis. Recruitment of inflammatory cells is also conditioned by pro-inflammatory factors that are produced by activated hepatic stellate cells⁸, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) secreted by adipose tissue, hepatocytes, and Kupffer cells, or late the of the activity cytokine high-mobility group protein B1 (HMGB1), which is activated by toll-like receptors 4 (TRL-4)^{9, 10}. Another NASH-related protein is the cyclooxygenase-2

(COX-2), which exhibits increased expression in animals with NASH¹¹, as well as a c-Jun N-terminal kinase (JNK), which is involved in the inflammatory route during the second phase of NASH¹².

These events lead to a vicious cycle that worsens the hepatic condition, leading to activation of fibrotic processes in the liver. In response to the activation of inflammatory hepatic stellate cells, increased expression of factors linked to the development of fibrosis can be observed, including connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor beta (TGF- β)¹³ and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), which is involved in the remodeling processes during fibrogenesis¹⁴, and amphiregulin (AREG), which is a member of the epidermal growth factor family¹⁵.

The pathophysiological mechanisms underlying progression from steatosis to NASH remain obscure, due in part to the lack of an appropriate experimental animal model. The methionine- and choline-deficient (MCD) diet is frequently used to establish NASH in the mouse liver¹². Previous studies have revealed that this model produces steatohepatitis, inflammation, and liver fibrosis that is histologically similar to human NASH^{4, 16-18}. Yet, while hallmarks of NASH such as steatohepatitis and fibrosis are obvious in this mouse model, the loss of weight rather than weight gain and the development of insulin resistance¹⁹ are atypical²⁰.

With regard to the treatment of NASH, so far, no specific therapy has shown conclusive results²¹. According to the theory of two hits, NASH can be expressed on an axis based on the involvement of oxidative stress in disease progression. Quercetin (Q) is a flavonoid aglycone present in large amounts in vegetables, fruits, tea and red wine, and it represents the plant-based antioxidant with the highest antioxidant potential, protecting cells against reactive oxygen species (ROS)²². Daily intake of Q is estimated at up to 25 mg/day in a normal human diet²³. Its chemical structure²⁴ presents a phenolic hydroxyl, which imparts

an antioxidant activity with significant therapeutic potential against many diseases, including hepatic diseases, ischemic heart disease, atherosclerosis, cancer and kidney and stomach damage^{25,26-32}.

This study was designed to assess liver alterations in an experimental model of NASH using a diet deficient in methionine and choline based on Brazilian-made animal food¹⁸ and to investigate the potential of quercetin to delay or prevent inflammation and fibrosis progression in mice with NASH.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In this trial, 32 male C57BL/6 mice were used. They were 8 weeks old and weighed 25 g on average. They were obtained from the Multidisciplinary Center of Biological Investigation of the University of Campinas (CEMIB-UNICAMP), Campinas, São Paulo. The animals were kept in polypropylene cages (47x34x18 cm) under standard conditions, with 10 animals in each cage. Water and food were provided ad libitum, and a 12 h light/dark cycle (light cycle from 7 a.m. to 7 p.m.) as well as a controlled temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$) and humidity level ($55 \pm 5\%$) were maintained in the Animal Experimentation Division of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

Diet composition

The methionine- and choline-deficient (MCD) diet was manufactured at our request and guidance by the Brazilian company PragSoluções[®], as described by Newberne and

Camargo³³ with modifications by Marcolin et al.¹⁸. Two types of rations were manufactured: MCD and the control ration, which was identical to MCD but contained adequate amounts of both amino acids.

Experimental procedure

NASH was induced by providing the animals with the MCD ration *ad libitum* for 4 weeks. The animals in the control group received the same ration, but with the addition of adequate concentrations of methionine and choline.

The animals were randomly divided in four groups with 8 animals in each group: control+vehicle (CO+V): the mice received the control ration (with the addition of methionine and choline) plus vehicle; control+quercetin (CO+Q): the mice received the control ration plus 50 mg/kg Quercetin; non-alcoholic steatohepatitis plus vehicle (NASH+V): the mice received the MCD diet plus vehicle; and non-alcoholic steatohepatitis plus quercetin (NASH+Q): the mice received the MCD diet plus 50 mg/kg Quercetin.

The vehicle was composed of 1% sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) and was also utilized as a carrier for Q. A total of 50 mg / kg bodyweight of Quercetin ([C₁₅H₁₀O₇], CAS Registry Number 117-39-5, Sigma Chemical CO[®], USA) was intragastrically administered for 4 weeks. One week prior to the beginning of the study, all animals began receiving the control ration to allow for adaptation to the new diet.

All experimental procedures were performed according to the standards established by the Health Research and Ethics Commission of the Research and Postgraduate Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) as described in Principles for Research Involving Animals (NAS)³⁴ under protocol number 09-050.

Experimental design

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

After 4 weeks, the animals were weighed and anesthetized by inhalation of Isoflurane[®] so that their blood could be sampled from the retro-orbital plexus to evaluate the liver function and perform a biochemical analysis. The animals were sacrificed at the end of the experiment by exsanguination under deep anesthesia, followed by cervical dislocation as described in the AVMA Guidelines on Euthanasia³⁴. The liver was removed by median ventral laparotomy with total hepatectomy. Samples were prepared for the histological and immunohistochemical analyses, and the remaining tissue was frozen in liquid nitrogen for the remaining analyzes.

The livers were sectioned, and sections of the lobes were prepared for histology by fixation in 10% formaldehyde solution for 24 h and embedding in paraffin blocks for subsequent staining.

Histological analysis

For the microscopic analysis, the slides containing the liver fragments were stained with hematoxylin-eosin (HE) and subsequently assessed by a single pathologist who was blinded to the experimental groups. The minimum histological criterion for the diagnosis of NASH was the presence of steatosis associated with hepatocellular ballooning involving zone 3 and lobular inflammatory infiltrate¹⁶. Mallory bodies and sinusoidal fibrosis involving zone 3 were either present or not³⁵. The grading of both necro-inflammatory activity and fibrosis was performed according to the classification proposed by Brunt et al.³⁶. The scoring system used for NASH classification was as recommended by the Pathology Committee of the NASH

Clinical Research Network³⁷, which semi-quantitatively classifies each case as steatosis (0-3), lobular inflammation (0-2), hepatocellular ballooning (0-2), and fibrosis (0-4).

In the HE staining, the qualitative analysis was performed using a Nikon Labophot (Tokyo, Japan) binocular microscope. The percentage of fibrosis in the liver tissue was determined based on a histomorphometric analysis performed with a microscope equipped with a digital camera and connected to an image-capturing program (Image-Pro Plus by Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). After analyzing twenty random fields per image, the ratios of conjunctive tissue relative to whole liver were calculated, and the results are expressed as scores based on the number of pixels.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry using a polyclonal antibody against alpha smooth muscle actin (ab5694 - α -SMA - Abcam[®]) was performed to detect activated hepatic stellate cells. Each section was deparaffinized by xylene and rehydrated with a graded series of alcohol. Antigen retrieval was performed in a microwave oven (300W) in citrate buffer (pH 6.0) for 10 min at 100°C. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of the slides in absolute methanol containing 3% hydrogen peroxide for 10 min at room temperature. The sections were sequentially preincubated with 10% normal rabbit serum for 10 min at room temperature to block the possible background staining by the secondary antibody. They were then incubated with the antibody α -SMA at a working dilution of 1:200. After 60 min at room temperature, the slides were treated with EnVision reagent for 30 min. The slides were washed 3 times with PBS after each incubation, and 3,3'-diaminobenzidine was employed as a chromogen. The nuclei were lightly counterstained with hematoxylin solution. The primary antibodies were replaced with PBS containing 0.1% bovine serum albumin as a negative control. Pathological findings were assessed by a single pathologist who was blinded to the

experimental groups using a light microscope equipped with a digital camera and connected to the image capture board of a computer using the Image-Plus software. The results are expressed as the mean percentage of positively stained pixels for the for expression of α -SMA in the liver.

Liver integrity analysis

Liver integrity was assessed by measuring blood levels of the enzymes aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) and expressed in U/L.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted and reverse transcribed using a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems[®])³⁸. The cDNA was amplified using the TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems[®]) with a Step One Plus instrument (Applied Biosystems[®]). Each assay included a no-template control and an RT-negative control. Relative changes in expression levels were determined using the 2^{-2DDCT} method³⁹. The cycle number at which the transcripts were detectable was normalized to the cycle number of HPRT gene detection, referred to as the DCT.

TaqMan primers were used for tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Rn01525859_g1 and GenBank accession n° NP036807.1), cyclooxygenase-2 (COX-2) (Rn01483828_m1 and GenBank accession n° AF233596.1), transforming growth factor *beta* (TGF- β) (Rn00572010_m1 and GenBank accession n° AY550025.1), high-mobility group protein B1 (HMGB-1) (Rn02377062_g1 and GenBank accession n° BC081839.1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (Rn00579162_m1 and GenBank accession n° U24441.1),

connective tissue growth factor (CTGF) (Rn01537279_g1 and GenBank accession n° AB023068.1) and amphiregulin (AREG) (Rn00567471_m1 and GenBank accession n° X55183.1). These genes were assessed using TaqMan expression assays performed using the TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems[®], Foster City, USA)

Western blotting analysis

Lysate proteins were fractionated by SDS-PAGE, and Western blotting was performed using the corresponding primary antibodies. Bound antibody was detected by enhanced chemiluminescence. Membrane rehybridization with a GAPDH antibody was performed to confirm equal loading of the samples⁴⁰.

Antibodies against toll-like receptor 4 (TLR-4) (110 kDa), c-Jun N-terminal kinases and the phosphorylated isoform (JNK/pJNK) (46 e 54 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) and anti-GAPDH (Sigma Chemical CO[®], USA) were used.

Statistical analysis

The results are expressed as the means \pm standard error of the mean (SEM). The data were analyzed using ANOVA. When a significant effect was found, post-hoc comparisons were conducted using the *Student Newman Keuls* test for independent samples. To assess the statistical significance of the histological and immunohistochemical analysis, the Kruskal-Wallis test for independent samples was used. A value of $P < 0.05$ was considered significant. All calculations were performed using the SPSS 14.0 statistical software.

RESULTS

Morphological and histopathological analyses

All of the mice submitted to the study completed the 4-week diet period. No animals were lost due to the MCD diet. The animals showed a high level of acceptance of the MCD diet, and we suggest using the control ration prior to the first week so that they can adapt to the new diet.

Regarding the histological findings, no animal receiving the control ration presented histological alterations. All animals were considered to have normal livers (Table 1).

The animals in the NASH group who received the MCD diet for 4 weeks exhibited microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis above grade 1, and hepatocellular ballooning (Figure 1 and Table 1). The inflammatory process was indicated to have a mean grade of 2.30 ± 0.21 in the NASH group. A diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis was confirmed in all of the animals in the NASH groups (Tables 1). Significant reductions in the scores for microvesicular steatosis, macrovesicular steatosis, ballooning and inflammation were observed in the animals treated with Q (Table 1, Figure 1B).

Immunohistochemistry analyses

As the hepatic stellate cells are considered to be a main source of the extracellular matrix in liver, we identified these cells by immunostaining using an antibody for α -SMA, a marker of activated hepatic stellate cells.

The animals in the NASH groups presented α -SMA-positive cells (Figure 2 – 2C and 2D), and a significant reduction was noted in the number of activated cells in the NASH group treated with Q (NASH+Q) (Figure 2 –2D and Graphic 2E).

Liver integrity and biochemical analyses

The plasma levels of the liver enzymes ALT and AST were significantly elevated (6x and 8x, respectively) in the animals in the NASH groups (Table 2), and significant improvements were observed in the groups treated with Q after 4 weeks. The levels of ALP did not differ between groups.

Progression of inflammation and fibrosis

To determine whether quercetin was able to ameliorate the inflammatory and fibrosis processes, we analyzed the effect of NASH on the mRNA expression of genes involved in hepatic inflammation and fibrogenesis.

The expression of genes involved in inflammation, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2) and high-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB-1), was increased in the NASH groups (Table 3). However, in the Q-treated NASH animals, there was a significant reduction in the expression of these genes by $47.05\pm 0.5\%$, $49.71\pm 0.5\%$ and $61.09\pm 0.2\%$, respectively.

The transforming growth factor beta (TGF- β), which is considered an anti-proliferative factor, was increased by $42.62\pm 0.2\%$ in the NASH+Q group compared to the NASH+V group (Table 3).

The expression of genes involved in fibrosis, such as connective tissue growth factor (CTGF), amphiregulin (AREG) and the matrix metalloproteinase (MMP) proteins, was increased in the NASH groups compared to control groups (Table 3). There was an important and statistically significant increase in the expression of AREG in the NASH+V group at 4 weeks.

The antioxidant quercetin appears to reduce the expression of fibrotic genes, as presented in Table 6.

The expression of the toll-like receptor-4 protein (TLR-4) showed an increase in the NASH+V group (Figure 3). However, in the groups treated with quercetin, there was a significant reduction in the expression of these proteins. The same result was observed regarding the protein expression of the phosphorylated form of c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Figure 4).

DISCUSSION

Experimental diets represent a useful tool for researchers because they allow for a rapid delivery of results and disease progression. These experiments provide a better understanding of the physiopathology and help to clarify the mechanisms involved in the transition from steatosis to NASH, allowing for tests of the effectiveness of the various drugs available for treatment²¹. In our study, we investigated the effect of quercetin supplementation on the livers of rodents with experimental nonalcoholic steatohepatitis.

In our previous study, it was demonstrated that choline- and methionine-deficient diets efficiently promoted NASH progression in only two weeks, with characteristics similar to

those observed in humans¹⁸. The MCD diet is considered to be the main model used for studying NASH^{20, 41, 42}.

Accumulated data reveal that this model produces steatohepatitis, inflammation, and liver fibrosis that is histologically similar to human NASH^{4, 16-18}. However, while hallmarks of NASH such as steatohepatitis and fibrosis are obvious in this mouse model, the occurrence of weight loss rather than gain is atypical²⁰. In our previous study, we demonstrated that animals subjected to the MCD diet lost weight and had reduced systemic levels, but increased hepatic levels of glucose, cholesterol and triglyceride¹⁸.

Experimental and epidemiological studies have shown that chronic ingestion of ethanol causes depletion of nutrients such as choline, folate, and methionine due to the toxic effects of alcohol on their metabolism^{43, 44}, inducing steatohepatitis. Accordingly, diets lacking methionine and choline were developed as a treatment for NASH induction in rodents producing the main characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in humans⁴⁵.

A number of beneficial effects of Q on human health have been shown, and some studies^{32, 46} have indicated an important role for Q in fighting the deleterious effects of reactive oxygen species and in the inhibition of redox-sensitive signaling pathways³⁰. In this study, we observed a significant reduction in parameters associated with hepatic integrity (ALT and AST), indicating a probable role of quercetin in protecting the liver in animals with NASH (Table 2).

Rodents fed the MCD diet develop severe steatosis, particularly in zone 3 (pericentral), and subsequently develop necroinflammation (especially in lymphocytes and polymorphonuclear neutrophils) and steatohepatitis, leading to progressive fibrosis⁴⁷⁻⁴⁹. The results obtained with our model are similar to those reported in previous studies (Figure 1). Our results indicate that quercetin may influence the process by presenting a reduction in

fibrosis scores of steatosis and ballooning in the histopathological analysis, which was observed in similar studies^{30, 32, 50}.

The MCD diet is extremely effective as an experimental model for the development and study of NASH. Since the mid 1940s⁵¹, this diet has been refined and used for inducing a form of NASH that is similar to the human disease, with implications concerning oxidative stress, elevated levels of TNF α , and increased lipid levels⁴⁸. Thus, the use of this experimental model is suggested for the study of this disorder and new potential forms of treatment.

With an increasing number of studies on the pathogenesis of NASH, the mechanisms of liver cell injury and fibrosis are becoming more clear, and the majority of the attention is currently focused on free fatty acid (FFA)–induced cytokine, oxidative stress–mediated injury, and the inflammatory mediators of fibrosis^{13, 52, 53}.

Pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor (TNF- α), are produced directly by hepatocytes in response to an increased supply of FFA and/or by adipose tissue macrophages that increase during obesity⁵⁴, as indicated by our findings (Table 3). Cytokines may also be produced by Kupffer cells in response to hepatocyte-derived cytokines or gut-derived endotoxin.

In the initial stage of inflammation, the Kupffer cells secrete pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor. Excess TNF- α production is a typical feature of liver disease as well as NASH⁹, as observed in our findings (Table 3). Tumor necrosis factor is a pleiotropic cytokine that induces cellular responses, such as proliferation, production of inflammatory mediators, and cell death⁵⁵. TNF- α plays a dichotomous role in the liver, where it not only acts as a mediator of cell death but also induces hepatocyte proliferation and liver regeneration⁵⁵. Quercetin appears to reduce the expression levels of TNF- α within 4 weeks (Table 3). Previous studies have demonstrated that quercetin is a type of flavonoid with anti-

inflammatory and anti-carcinogenic activities that is known to be found in many fruits, vegetables, nuts and red wine^{56, 57}.

HMGB1 is considered to be a late cytokine activity when considering the time of release of other cytokines, such as IL-1 classical and TNF- α . It can be found in the extracellular space as a result of two processes. It can be actively secreted by cells that participate in the inflammatory process such as macrophages, or it can be released by cell necrosis¹⁰. In the extracellular space, its signal is transduced through the binding of plasma receptors. It is known that the action of HMGB is to activate the nuclear factor *kappa* B by binding to Toll-like receptors 2 and 4 (TRL-4), resulting in transcription of pro-inflammatory genes⁵⁸. In our study, we found a high level of expression of both TNF- α , HMGB-1 and TRL-4 in animals with NASH, which demonstrates the activation of the inflammatory process (Table 3 and Figure 3). However, a decrease in these parameters was observed with the use of the antioxidant quercetin, suggesting an important anti-inflammatory action. Similar findings have been reported in the literature, indicating that quercetin acts as a protective factor against inflammation^{59, 60}.

Animal studies have demonstrated a relationship between COX-2 and steatohepatitis, demonstrating that this interaction may have a role in the inflammatory pathways of non-alcoholic steatohepatitis. However, the relationship between COX-2 expression and steatohepatitis in humans has not been studied in detail¹¹. In our findings, we observed a significant increase in the expression of COX-2 in animals with NASH, indicating the activation of the inflammatory process in NASH induced by the MCD diet (Table 3). Studies have demonstrated the positive correlation between COX-2 and steatosis, inflammation, hepatocyte ballooning and fibrosis, and COX-2 may have a role in the pathogenic inflammatory pathways of NASH^{11, 61}. Supplementation with quercetin reduced the

expression of COX-2, which indicates a reduction in the activation of the inflammatory pathway (Table 3).

The c-Jun N-terminal kinase (JNK) has been proposed to play a role in both the second hit of NASH¹². Hepatic oxidative stress can activate JNK to mediate inflammation through activator protein-1-dependent transcription of pro-inflammatory cytokines. Indeed, the JNK isoforms, especially JNK1, contribute to the development of hepatic steatosis and steatohepatitis in mice⁶², which was observed in our study (Figure 4). However, the mechanisms underlying the contribution of JNK to the development of NASH-induced hepatic fibrosis, which leads to the most important clinical consequences of cirrhosis, namely liver failure and hepatocellular cancer, are still unresolved, partly because a high-fat diet fails to induce liver fibrosis and the MCD diet results in minimal fibrosis and substantial body weight loss¹². The antioxidant Q appears to act by negatively influencing the activation of this protein. Quercetin, one of the most abundant flavonoids, is a potent scavenger of oxygen free radicals and a metal chelator^{63, 64}. In our previous study, we found that Q is an important antioxidant and improves the index of DNA damage in NASH⁵⁰.

Fibrosis is thought to arise as part of the normal healing response to inflammation and injury, although evidence has suggested that factors related to obesity and insulin resistance may be directly fibrogenic⁵⁴.

Steatohepatitis is characterized by the presence of fibrosis. However, little is known about the mechanisms of fibrogenesis linked to steatosis in human liver. The most frequently proposed mechanism is the activation of hepatic stellate cells by cytokines and oxidative stress^{13, 65, 66} as well as an increase in the amount of connective tissue growth factor (CTGF) and leptin⁶⁷, leading to the activation of TGF- β ⁶⁸. We found that the significant increase in the expression of CTGF in animals with NASH is progressive and a reduction of CTGF were detected in the groups treated with quercetin (Table 3). The activation of hepatic stellate cells

seems to be reduced by supplements with quercetin, as indicated by the results presented in Figure 2.

TGF- β is one of the main cytokines involved in regulating the formation and degradation of the extracellular matrix and, thus, the fibrotic processes¹³. TGF- β may be considered a potent inhibitor of proliferation in epithelial cells, and it acts as a tumor suppressor⁶⁹. Furthermore, the levels of TGF- β fall precisely during the period when there is a significant increase in the development of hepatic fibrosis (Table 3). This may explain the increased fibrosis that is observed during the period of this study (4 weeks). The use of Q tends to result in levels that approach the levels found in control animals.

Matrix metalloprotease-9 (MMP-9) in the liver is involved in the remodeling processes of fibrogenesis¹⁴. MMPs are generally expressed at low levels in normal tissues, but under certain physiological and pathological conditions, they are upregulated⁷⁰. Our results show a significant increase in the expression of MMP-9 in the NASH+V group (Table 3), but a significant decrease was observed in the treated groups (NASH+Q). It is well established that variations in the expression of MMPs are correlated to the fibrotic stage of liver diseases. Thus, it is important to understand the mechanisms involved and the role of MMPs in the course of diseases that induce fibrogenesis¹⁴, particularly due to the high risk for progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in NASH.

The survival and proliferative signals triggered during this process are conveyed by a complex network of cytokines and growth factors that act in an orderly manner. Activation of the epidermal growth factor receptor is thought to play an important role in liver regeneration. Amphiregulin (AREG) is a member of the epidermal growth factor family, and its expression is not detectable in healthy liver¹⁵. In the NASH groups, we observed an increase in the expression of AREG in the liver (Table 3). AREG shows bifunctional properties, stimulating the proliferation of a variety of normal cells and inhibiting that of many tumor cell lines.

Previous studies have demonstrated that AREG expression is detected in the livers of cirrhotic patients and is rapidly induced in the livers of rodents with steatohepatitis¹⁵. In our study, we observed a significant reduction in the expression of AREG in animals supplemented with quercetin (Table 3), indicating the effect of quercetin on hepatic protection in NASH.

In addition to being a well-accepted marker of myofibroblast differentiation, α -SMA (alpha-smooth muscle actin), a known marker of hepatic myofibroblasts, has been suggested to play a role in the production of contractile force during wound healing and fibrocontractive diseases⁷¹, which can be observed in our study results (Figure 2). When liver injury occurs, they become activated and trans-differentiate into myofibroblast-like cells, which are proliferative cells that lose their vitamin A droplets, express α -SMA, and secrete profibrogenic mediators and extracellular matrices proteins⁷².

The antioxidant properties of Q have been investigated⁷³ quite extensively, and there is evidence that its mechanism of action involves the direct⁷⁴ scavenging of radicals as well as indirect activation of 344 transcription factors that regulate the expression of genes encoding antioxidant enzymes⁷⁵. As can be seen in our results, quercetin also results in reduced expression of SMA, leading to a reduction of myofibroblast-activated marking (Figure 2).

In conclusion, our findings indicate that quercetin treatment, a flavonoid antioxidant, results in the reduced expression of inflammatory factors, such as the factors that promote liver fibrosis, in this model. Supplementation of quercetin appears to be important to reduce or at least slow the progression of NASH in mice fed with the MCD diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Research Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA protocol number 09-050) and the staff at the Laboratory of Experimental Hepatology and Physiology of HCPA for their excellent scientific support. Student doctor Éder Marcolin wishes to thank the Research Incentive supported by grants from the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are particularly grateful to the Fundação Oswaldo Cruz – Bahia (FIOCRUZ) and the Universidad de León (Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas – CIBERehd).

REFERENCES

1. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011;412:1297-305.
2. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
3. Day C. NASH-related liver failure: one hit too many? *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2058-62.
4. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.
5. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
6. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2002;16:663-678.
7. Day CP. Mechanisms of Steatosis: Is steatosis still the first hit? *EASL 2009;Programs and Abstracts EASL special conference - NAFLD/NASH and related metabolic diseases* 63-64.
8. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52:59-69.

9. Valenti L, Fracanzani A, Dongiovanni P. Tumour necrosis factor promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:272-280.
10. Andersson B, Wang H, Tracey K. High molility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokyne synthesis in monocytes. *J Exp Med* 2000;4:565-570.
11. Yapali S. THE ROLE OF COX-2 EXPRESSION ON STEATOHEPATITIS AND FIBROSIS IN NON-ALCOHOLIC LIVER DISEASE. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2011.
12. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, Osterreicher CH, Schnabl B, Seki E, Brenner DA. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1467-1477 e5.
13. Day C. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207-210.
14. D'Amico F, Consolo M, Amoroso A, Skarmoutsou E, Mauceri B, Stivala F, Malaponte G, Bertino G, Neri S, Mazzarino M. Liver immunolocalization and plasma levels of MMP-9 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatitis C infection. *Acta Histochemica* 2010;112:474-481.
15. Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005;128:424-32.
16. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathological features of NASH. *Front Biosci* 2005;10:1475-84.
17. Leclercq IA. Pathogenesis of steatohepatitis: insights from the study of animal models. *Acta Gastroenterol Belg* 2007;70:25-31.
18. Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol* 2011;48:72-9.
19. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *journal of Hepatology* 2003;40:47-51.
20. Pelz S, Stock P, Bruckner S, Christ B. A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation. *Exp Cell Res* 2012;318:276-87.
21. Zamin I, Jr., Mattos AA, Mattos AZ, Migon E, Soares E, Perry ML. [Model of experimental nonalcoholic steatohepatitis from use of methionine and choline deficient diet]. *Arq Gastroenterol* 2009;46:69-74.
22. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993;20:21-9.
23. Dajas F., Rivera-Megret F., Blasina F., Arredondo F., Abin-Carriquiry J.A., Costa G., Echeverry C., Lafon L., Heizen H., Ferreira M., A. M. Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res.* 2002;36:1613-1620.
24. Chobot V. Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *J Agric Food Chem* 2010;58:2088-94.
25. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 2007;137:718S-737S.

26. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33:1061-80.
27. Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM, Egido J, Mayoral P, Arevalo MA, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol* 2006;44:2092-100.
28. Morales AI, Vicente-Sanchez C, Jerkic M, Santiago JM, Sanchez-Gonzalez PD, Perez-Barriocanal F, Lopez-Novoa JM. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;210:128-35.
29. Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Cakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg* 2006;106:68-72.
30. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zetler C, Marroni C, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1939-46.
31. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000;33:742-50.
32. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 2009;139:1339-46.
33. Newbere PM, Camargo J.L.V.D., A.J. C. Choline Deficiency, Partial Hepatectomy and Liver Tumors in Rats and Mice. *Toxicologic Pathology* 1982;10:95-106.
34. AVMA updates its euthanasia guidelines. *Veterinary Records [S.I.]* 2007b;161:502-502.
35. Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004;8:861-79, ix.
36. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005;33:68-71.
37. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
38. Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:221-9.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
40. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2003;66:439-45.
41. London RM, George J. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clin Liver Dis* 2007;11:55-74.
42. Oliveira MC, Borrás MRL, Silva EA, Roland IA. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Serra Negra, Brasil, 1995.
43. Barak AJ, Beckenhauer HC. The influence of ethanol on hepatic transmethylation. *Alcohol* 1988:73-77.

44. Trimble KC, Molloy AM, Scott JM, Weir DG. The effect of ethanol on one-carbon metabolism: increased methionine catabolism and lipotrope methyl-group wastage. *Hepatology* 1993;984-989.
45. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123-32.
46. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008;585:325-37.
47. George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2003;39:756-764.
48. 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;105:1067-75.
49. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996;111:1645-1653.
50. Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Rodrigues G, Borghetti GS, Bassani VL, Picada JN, Marroni NP. The use of Antioxidant Quercetin in Preventing Liver DNA Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, in press.
51. Engel RW, Salmon WD. Improved diets for nutritional and pathologic studies of choline deficiency in rats. *J Nutri* 1941;22:109-121.
52. De Alwis N, Day C. Non alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008.
53. Galizzi F^o J, Cotrim H, Parise E, Oliveira C. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Esteato-Hepatite e suas correlações. Yendis, 2011.
54. de Alwis N, Day C. Genes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Current Diabetes Reports* 2008;8:156-163.
55. Schwabe R, Brenn D. TNF-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G583-G589.
56. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009;50:1756- 1764.
57. Berdichevsky Y, Zemel R, Bachmatov L. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 serine protease inhibitors. *J Virol Methods* 2003;107:245-255.
58. Yu M, Wang H, Tracey K, Yang H. HMGB1 signals through toll-like receptor (TRL) 4 and TLR2. *Shock* 2006;26:174-9.
59. Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nussler AK, Liu L. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2011;24:516-22.
60. Liu CM, Zheng YL, Lu J, Zhang ZF, Fan SH, Wu DM, Ma JQ. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;29:158-66.
61. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
62. Schattenberg J, Singh R, Wang Y, al. e. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006:163-172.
63. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003;48:824-9.

64. Martinez-Florez S, Gutierrez-Fernandez B, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005;135:1359-65.
65. Matteoni C, Younossi Z, Gramlich T. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-1419.
66. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998;27:1463-6.
67. Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, Sebah M, Franc B, Chevalier S, Debuire B, Dudoit S, Lemoine A. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. *Lab Invest* 2006;86:154-65.
68. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004;40:46-54.
69. Seoane J. Escaping from the TGFb anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006;27:2148-2156.
70. Ries C, Petrides P. Cytokine regulation of matrixmetallo-proteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem.* 1995:345-55.
71. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 1999;250:273-283.
72. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:74-9.
73. Kim GN, Jang HD. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1171:530-7.
74. Farombi EO, Fakoya A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:1120-8.
75. Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antunez K, Jones DP, Go YM, Liang YL, Dajas F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med* 2010;49:738-47.

RESULTS

FIGURE 1 Photomicrographs of livers from NASH+V and NASH+Q animals. (H-E, 100x). The arrows in images 1A and 1B show the microvesicular steatosis (M), ballooning (B) and inflammation (I).

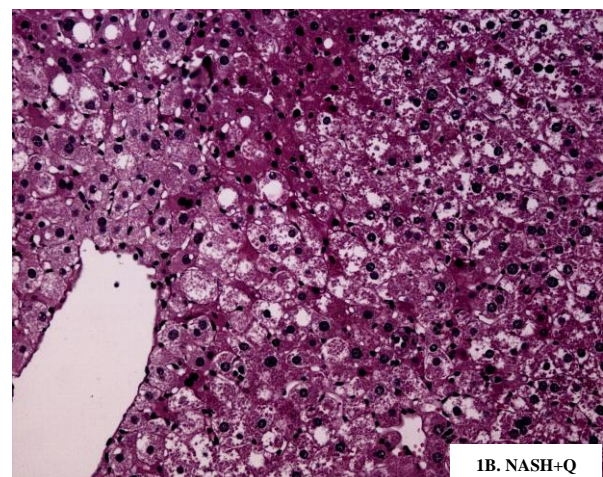
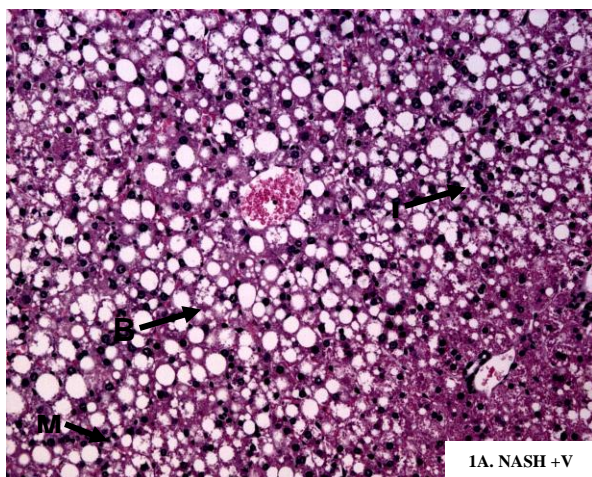


TABLE 1 Histopathological scores of animals after 4 weeks of treatment

Item	Definition	Score	CO+V (n=5)	CO+Q50 (n=5)	NASH+V (n=10)	NASH+Q50 (n=10)
Steatosis	<5%	0				
	5% - 33%	1	0	0	2.60±0.163	1.06±0.202*
	>33% - 66%	2				
	>66%	3				
Microvesicular Steatosis	Not Present	0	0	0	0.90±0.099	0.33±0.153*
	Present	1				
Inflammation	None	0				
	<2 foci per 200x field	1	0	0	2.30±0.213	0.78±0.204*
	2-4 foci per 200x field	2				
	>4 foci per 200x field	3				
Ballooning	None	0				
	Few balloon cells	1	0	0	1.70±0.152	0.61±0.192*
	Many cells	2				
	Prominent ballooning	3				

*Statistically significant differences between the groups using the Kruskal-Wallis test for independent samples; P<0.05.

FIGURE 2 Immunohistochemistry results for α -SMA in mice liver sections (original magnification: 200x) after 4 weeks of treatment: (2A) CO+V; (2B) CO+Q; (2C) NASH+V; and (2D) NASH+Q. The yellow cells indicate α -SMA-positive cells. The graph shows the mean percentage (%) of positively stained pixels based on the immunohistochemical staining of α -SMA in the livers of the mice (2E).

* Statistically significant difference between the CO and NASH groups using the Kruskal-Wallis test for independent samples; $P < 0.05$, $n = 8$.

** Statistically significant difference between the NASH+V and NASH+Q groups using the Kruskal-Wallis test for independent samples; $P < 0.05$, $n = 8$.

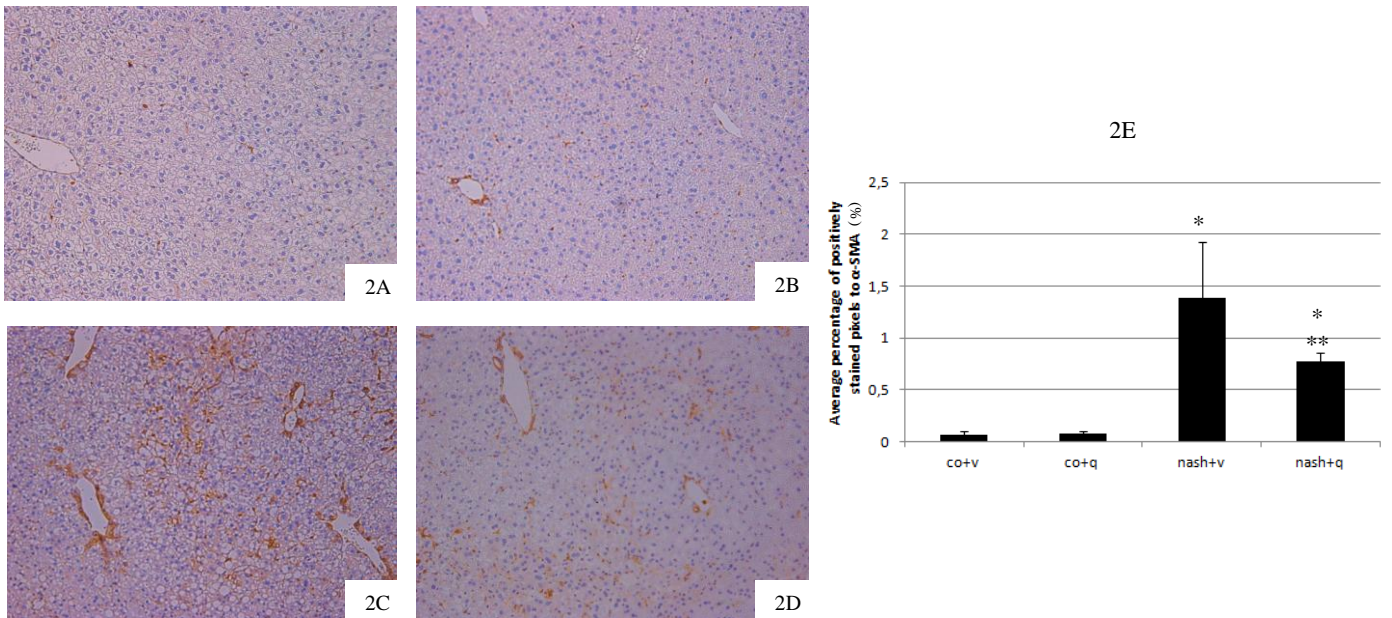


TABLE 2 Liver integrity analyses

<i>Test</i>	<i>CO+V</i>	<i>CO+Q</i>	<i>NASH+V</i>	<i>NASH+Q</i>
AST	114.33±4.4	116±5.2	687.33±12.8*	335.94±4.9* **
ALT	56±4.2	29.5±1.3	469.86±12.3*	327.92±6.1* **
ALP	106±5.9	89.75±3.5	97.6±2.6	96.5±1.9

Values are means ± SEM, n=16.

*Statistically significant difference between the CO and NASH groups using the Student Newman Keuls test; P<0.05.

**Statistically significant difference between the NASH+V and NASH+Q using the Student Newman Keuls test; P<0.05.

TABLE 3 Effect of treatment with quercetin on liver mRNA levels of genes related to inflammation and fibrosis in mice with NASH induced by the MCD diet

<i>Test</i>	<i>CO+V</i>	<i>CO+Q</i>	<i>NASH+V</i>	<i>NASH+Q</i>
TNF-α	1.0	1.0 \pm 0.1	7.65 \pm 0.7*	4.05 \pm 0.6**
HMGB-1	1.0	1.37 \pm 0.1	2.39 \pm 0.4*	0.93 \pm 0.2**
COX-2	1.0	1.35 \pm 0.3	7.08 \pm 0.8*	3.52 \pm 0.2**
CTGF	1.0	1.14 \pm 0.2	3.30 \pm 0.2*	1.56 \pm 0.1**
TGF-β	1.0	0.78 \pm 0.1	0.61 \pm 0.3*	0.87 \pm 0.4**
MMP-9	1.0	0.95 \pm 0.1	2.30 \pm 0.1*	1.43 \pm 0.3**
AREG	1.0	1.18 \pm 0.1	606.35 \pm 2.8*	364.59 \pm 2.1**

Values are means \pm SEM. n=8. Levels of mRNA were analyzed by real-time PCR assays and were normalized to GAPDH.

*Statistically significant difference between the CO+V and NASH+ V group using the ANOVA post-hoc comparisons and the Student Newman Keuls test; P<0.05.

**Statistically significant difference between the NASH+V and NASH+Q group using the ANOVA post-hoc comparisons and the Student Newman Keuls test; P<0.05.

FIGURE 3 Quercetin influences activation of the TLR-4 signaling system in NASH mice.

The total protein fraction (30 μ g) was analyzed by Western blotting with anti-TLR-4 antibodies. Equal loading of the proteins is illustrated by the GAPDH bands (A). Densitometric quantification of TLR-4 (B). Values are expressed as fold change (means \pm SEM) of duplicate samples. n=8.

*Statistically significant difference between the CO and NASH groups using the ANOVA test post-hoc comparisons Student Newman Keuls test; $P < 0.05$.

**Statistically significant difference between the NASH+V and NASH+Q group using the ANOVA test post-hoc comparisons Student Newman Keuls test; $P < 0.05$.

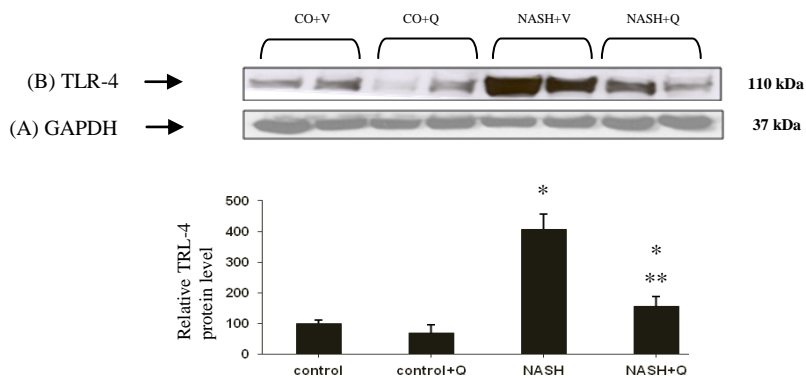
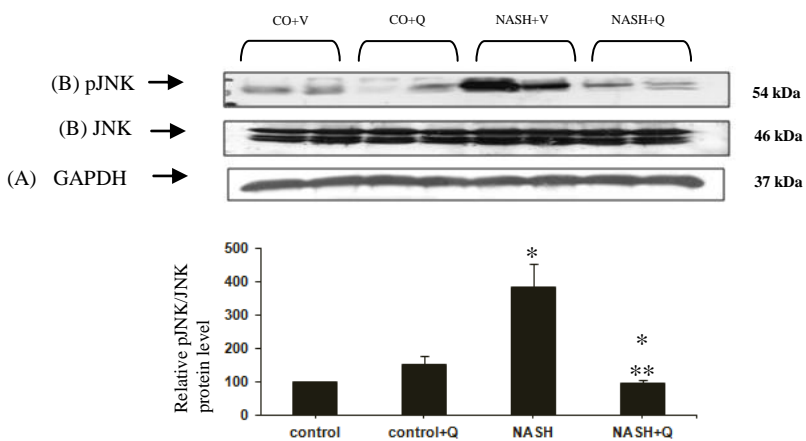


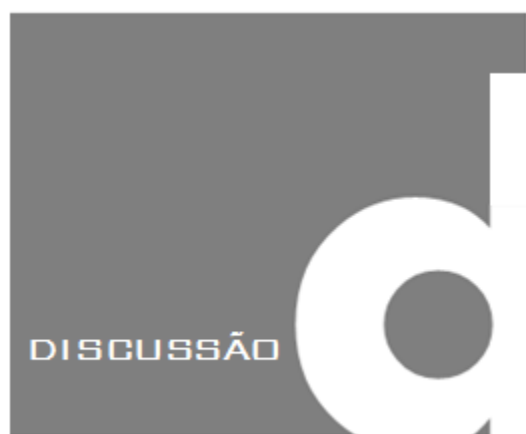
FIGURE 4 Quercetin influences activation of the pJNK and JNK signaling system in NASH mice.

The total protein fraction (30 μ g) was analyzed by Western blotting with anti-pJNK and JNK antibodies. The equal loading of the proteins is illustrated by the GAPDH bands (A). Densitometric quantification of pJNK and JNK (B). The values in graph are expressed by the relationship between pJNK/JNK (means \pm SEM) in duplicate samples. n=8.

*Statistically significant difference between the CO and NASH groups using the ANOVA test post-hoc comparisons Student Newman Keuls test; $P < 0.05$.

**Statistically significant difference between the NASH+V and NASH+Q group using the ANOVA test post-hoc comparisons Student Newman Keuls test; $P < 0.05$. Densitometric quantification of relation between pJNK/JNK.





5 DISCUSSÃO

Uma doença insidiosa¹⁸⁴, sem biomarcadores clínicos para sua detecção¹⁸⁵, diagnóstico realizado somente por biopsia¹⁸⁶, poucos ou quase nenhum sintoma¹⁸⁷, índices cada vez maiores na população mundial^{22, 44}, aparentemente sem respeitar sexo, etnia e nem idade⁴³, sem tratamento eficaz até o momento²², compõem o quadro que se enfrenta quando depara-se com a Esteato-Hepatite Não Alcoólica, ou seja, uma enfermidade pouco conhecida popularmente, porém com espectro de evolução bastante preocupante.

Conforme se apresentou nos parágrafos precedentes deste trabalho, a investigação da EHNA é de interesse mundial e de enfática importância. Estudos experimentais com ambiente, alimentação e fatores estressores controlados são fundamentais e amplamente utilizados pela comunidade científica⁷. Porém, em centros de pesquisa de países em desenvolvimento como o Brasil, muitas vezes estes estudos enfrentam inúmeras barreiras, como o alto custo e as dificuldades alfandegárias impostas pela importação dos implementos necessários para a execução do modelo de estudo.

Em se tratando do estudo da EHNA, o modelo experimental utilizando roedores alimentados com dieta deficiente dos aminoácidos metionina e colina é considerado como um dos melhores modelos, por apresentar características semelhantes à enfermidade em humanos¹¹. Mas, enfrentou-se todas as dificuldades citadas pela limitação de oferta da dieta específica no País. Esse foi o primeiro objetivo, propondo o desenvolvimento de um modelo eficaz que possuísse condições de ser executado de forma dinâmica e com custos viáveis.

Conforme os resultados apresentados no artigo *Methionine- and Choline-Deficient Diet Induce Hepatic Changes Characteristic of Non-Alcoholic Steatohepatitis*. Arq. Gastroenterol. V.48, nº 1, 2011 (Artigo I), cumpriu-se o primeiro, e talvez mais importante,

passo para o desenvolvimento deste projeto. Por meio de convênio firmado com a empresa PragSoluções Ltda, após um amplo estudo das rações MCD presentes no mercado internacional, foi desenvolvida uma ração para roedores com as características propostas para esse projeto: eficácia, empregabilidade e viabilidade.

Segundo desenvolvido por este autor, a oferta da dieta MCD desenvolvida, permite o aparecimento de um fígado com características idênticas ao de EHNA em apenas 2 semanas de administração da dieta, com um escore de esteatose apresentado em $1,44 \pm 0,229$ nos animais com EHNA, presença de balonização e processo inflamatório (Quadro 2 – Artigo I), o que caracterizou a doença.

Com o emprego de camundongos C57BL/6, a quantidade utilizada de ração torna o modelo ainda mais eficaz e viável, pela reduzida porção de alimento ingeridos por esses animais. Apesar das dificuldades com o trato deste animal, por sua agressividade e permanente agitação, a viabilidade, no que se refere a custos do projeto, justifica seu uso.

Com esse modelo pode-se comprovar a ação do estresse oxidativo no espectro patogênico da EHNA, onde encontrou-se elevado índice de peroxidação lipídica nos animais enfermos (Quadro 3 – Artigo 1). Conforme discutido no Artigo 1, as enzimas antioxidantes SOD e CAT não apresentaram diferença significativa entre os grupos, o que sugere que em 2 semanas ainda estejam ativadas as frentes de defesas antioxidantes. Já a GSH aparece incrementada justamente pela depleção de metionina, um reagente limitante da formação de GSH⁸⁸.

Neste contexto e tendo como fator preocupante a falta de uma terapêutica efetiva, seja para o tratamento ou na tentativa de reduzir os efeitos deletérios da EHNA, buscou-se o emprego de um comprovado e potente antioxidante: a quercetina, conforme tema desenvolvido no Artigo II: *The use of Antioxidant Quercetin in Preventing Liver DNA Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis*, submetido à *Digestive Diseases and Sciences*. A quercetina, um dos mais efetivos flavonóis antioxidantes naturais, com um consumo médio de 16 mg/dia, isto é, mais de 60% da ingestão média de flavonoides na dieta ocidental¹³⁶. Sua ação vem sendo demonstrada, em outros modelos, como na redução do colágeno, da expressão da iNOS e da lipoperoxidação na cirrose induzida por tetracloreto de carbono¹²⁷. Observou-se, também, sua ação na redução da imunorreatividade de células α -

SMA positivas e redução da proliferação ductular, atenuação dos sinais de necrose e dos nódulos regenerativos hepáticos em ligadura de ducto biliar comum¹⁸⁸.

Assim, foi proposto estudar os efeitos da suplementação de quercetina (50mg/kg de peso animal) em camundongos (C57BL/6) com EHNA, modelo experimental anteriormente padronizado. Então, nestas pesquisas aqui relatadas, observou-se uma melhora importante no fígado dos animais enfermos tanto histologicamente: redução da esteatose macro e microvesicular, da inflamação e da balonização (Quadro 1 – Artigo II), como nas enzimas que demonstram integridade hepática: AST e ALT (Quadro 3 – Artigo II). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos utilizando a Q como suplemento, como no tratamento da ligadura de ducto biliar comum¹⁸⁸ e na cirrose induzida por tetracloreto de carbono¹²⁷.

O modelo de EHNA por dieta MCD apresenta algumas distinções em comparação à doença em humanos, mesmo assim, é considerado o melhor modelo de estudo¹². O emagrecimento dos animais e a falta de resistência insulínica^{189, 190} devem estar cientes quanto ao uso deste modelo. Porém, o fígado apresenta todos os padrões característicos da EHNA. Isso se deve ao fator lipogênico da falta de metionina e colina, que são precursores de fosfatidilcolina, que é o revestimento fosfolípido da partícula de VLDL. Com o déficit desses aminoácidos, há um acúmulo de triglicerídeos no meio intra-hepático, sendo a chave para o desenvolvimento da esteatose e consequentes danos ao fígado¹⁹⁰. Nos resultados encontrados (Quadro 4 – Artigo II) observou-se uma redução significativa nas análises sistêmicas de HDL, colesterol total, triglicerídeos e glicemia, o que indica um acúmulo intra-hepático. Salienta-se que a quantificação intra-hepática desses fatores pode trazer resultados interessantes, o que pode conduzir a futuras investigações a respeito.

Outros dados estudados neste experimento foram a lipoperoxidação que apresentou-se aumentada nos animais EHNA e reduzida nos animais tratados (Quadro 5 – Artigo II), demonstrando o poder antioxidante da quercetina. A enzima antioxidante CAT apresentou uma leve redução no grupo EHNA+Q, o que pode ser justificado pela ação da quercetina como varredor de radicais livres^{134,138}.

Um dos achados de interesse nesse estudo foi a ação da quercetina com suas propriedades antioxidantes, apresentando uma redução no dano de DNA no fígado de animais com EHNA, pelo teste cometa (Quadro 6 – Artigo II). Os animais com EHNA apresentaram um aumento, tanto no índice como na frequência de dano, sugerindo que essa desordem possa

reduzir a estabilidade genômica do fígado¹⁹¹. O tratamento com quercetina por 4 semanas apresentou evidências, como as encontradas em outros estudos utilizando o ensaio cometa, onde foi evidenciado o papel protetor da Q como sequestrador de ERO, diminuindo quebras no DNA e bases oxidadas¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Conforme proposto no terceiro artigo: *Quercetin modulates the progression of inflammatory parameters and liver fibrosis in mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis*, a ser submetido à *Liver International Journal*, estudou-se os efeitos moleculares da suplementação da quercetina no fígado de animais com EHNA nos parâmetros inflamatórios e fibrose. Conforme o estudo anterior, verificou-se as alterações histopatológicas geradas pela EHNA e as consequentes ações da Q (Figura 1 e Tabelas 1 – Artigo III). Foram observadas melhoras significativas nos escores de esteatose macro e microvesicular, processo inflamatório e balonização em 4 semanas de tratamento com Q. Nesse sentido realizou-se estudo imuno-histoquímico, verificando a ativação de células estreladas através da coloração e identificação positiva de α -SMA, um marcador bem aceito de diferenciação de miofibroblastos hepáticos¹⁹⁵. Quando existe uma lesão no fígado, células hepáticas se diferenciam semelhantemente a miofibroblastos, proliferando-se e expressando α -SMA e secretam mediadores profibrogênicos e proteínas de matriz extracelular¹⁹⁶. Assim, nessas investigações observou-se um aumento significativo da marcação de α -SMA nos grupos EHNA. Já no fígado dos animais tratados com Q, houve uma redução importante e significativa dessa marcação, indicando uma ação da Q na redução do processo de fibrose (Figura 2 – Artigo 3).

No que se refere às análises das enzimas de integridade hepática (Quadro 2 – Artigo III), a quercetina mostrou-se eficaz na redução dos níveis de ALT, AST dos animais com EHNA, porém não retornaram aos níveis dos animais controles. O aumento concomitante das enzimas intracelulares ALT e AST no grupo enfermo indica um padrão de lesão hepatocelular, conforme é encontrado frequentemente na clínica¹⁹⁷.

Em se tratando dos genes relacionados ao processo inflamatório e à fibrose, observamos dados semelhantes aos encontrados na literatura. Acredita-se que os ácidos graxos livres induzam a ativação de citocinas, mediada por estresse oxidativo, ativando os fatores inflamatórios e a fibrose^{198, 199}.

Citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), são produzidas diretamente pelos hepatócitos em resposta a um aumento da oferta de AGL e/ou pelos macrófagos de tecidos adiposos aumentados durante obesidade¹⁹⁸, como pode ser visto nos resultados apresentados na Tabela 3 – Artigo III.

Na fase inicial da inflamação, as células de Kupffer secretam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral. A produção de TNF- α em excesso é uma característica típica na doença hepática, bem como a EHNA²⁰⁰, o que pode ser visto nos achados encontrados na Tabela 3 – Artigo III. O fator de necrose tumoral é uma citocina pleiotrópica que induz respostas celulares tais como a proliferação, a produção de mediadores inflamatórios e de *death cell*²⁰¹. TNF- α desempenha um papel dicotômico no fígado, onde não só atua como um mediador de morte celular, mas também induz a proliferação de hepatócitos no fígado e regeneração²⁰¹. A Q parece reduzir os níveis de expressão de TNF- α em 4 semanas de suplementação (Tabela 3 – Artigo III). Estudos demonstraram que a quercetina é um tipo de flavonóides com atividades anti-inflamatórias e anti-cancerígenas, conhecida por ser encontrada em muitas frutas, legumes, nozes e vinho tinto^{202, 203}.

A HMGB1 (proteína de alta mobilidade do grupo B1) é considerada uma citocina de atividade tardia quando comparada com o tempo e liberação clássicos de citocinas tais como IL-1 e TNF- α . Ela pode ser encontrada no espaço extracelular por dois processos. Ela pode ser ativamente secretada por células que participam do processo inflamatório como os macrófagos ou liberada por células necróticas²⁰⁴. No espaço extracelular, o seu sinal é transduzido a partir da conexão com os receptores plasmáticos. Sabe-se que a ação da HMGB1 é ativar o factor nuclear kappa B por ligação a receptores *Toll-like 2* e *4* (TRL-2 e -4), resultando na transcrição de genes pró-inflamatórios²⁰⁵. Neste estudo foi encontrada uma elevada expressão de TNF- α , HMGB-1 bem como TRL-4 em animais com EHNA, o que mostra a ativação da via inflamatória (Tabela 3 e Figura 3 – Artigo III), mas há uma diminuição nestes parâmetros com o uso de quercetina, apontando para uma ação anti-inflamatória importante.

Os estudos em animais demonstraram uma relação entre a COX-2 (ciclo-oxigenase-2) e esteato-hepatite, demonstrando que este pode ter um papel importante nas vias inflamatórias da esteato-hepatite não alcoólica. No entanto, a relação de COX-2 com o esteato-hepatite em humanos não foi estudada em detalhes²⁰⁶. Nos resultados encontrados podemos observar um aumento significativo na expressão de COX-2 em animais doentes, indicando a instalação do

processo inflamatório no modelo de EHNA por dieta MCD (Tabela 3 – Artigo III). Estudos têm demonstrado a correlação positiva de COX-2 com esteatose, inflamação, balonização de hepatócitos e fibrose, e a COX-2 pode ter um papel vital nas vias patogênicas inflamatórias da EHNA^{115, 206}. Já, na suplementação com a quercetina, os animais apresentaram reduzida expressão desta proteína, o que indica uma redução na ativação da via inflamatória (Tabela 6 – Artigo III).

A c-Jun N-terminal quinase (JNK) tem sido implicado em ambos os 2 *hits* da EHNA²⁰⁷. O estresse oxidativo hepático pode ativar a JNK para mediar a inflamação através do ativador de transcrição de proteína-1-dependente de citocinas pró-inflamatórias. Com efeito, a JNK contribui para o desenvolvimento de esteatose hepática e esteato-hepatite em camundongos²⁰⁸, o que pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 4 – Artigo III). No entanto, os mecanismos subjacentes à contribuição de JNK para o desenvolvimento de EHNA induzida pela fibrose hepática, levando às consequências clínicas mais importantes de cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular, ainda não são resolvidos, em parte porque uma dieta rica em gordura falha ao induzir fibrose hepática e a dieta MCD desenvolve uma mínima fibrose com substancial perda de peso corporal²⁰⁷. O antioxidante Q parece influenciar negativamente a ativação dessa proteína. Quercetina, um dos flavonóides mais abundantes, é um potente eliminador de radicais livres de oxigênio e um quelador de metais^{127, 209}.

A fibrose surge como parte da resposta de cicatrização normal à inflamação e às lesões, embora as evidências sugiram que os fatores relacionados à obesidade e resistência à insulina podem ser diretamente fibrogênicos¹⁹⁸.

A esteato-hepatite é caracterizada pela presença de fibrose. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de fibrogênese ligados à esteatose no fígado humano. O mecanismo mais frequentemente proposto é a ativação de células estreladas hepáticas por citocinas e estresse oxidativo^{47, 53, 199}, bem como um aumento na quantidade de fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e leptina²¹⁰, levando à ativação de TGF- β (fator de crescimento transformador β)⁶⁴. Encontrou-se um aumento significativo na expressão de CTGF em animais com EHNA e uma redução nos grupos tratados com quercetina (Tabela 3 – Artigo III). A ativação de células estreladas hepáticas parece ser reduzida pela suplementação de quercetina, tal como indica os resultados da Figura 2 (Artigo III).

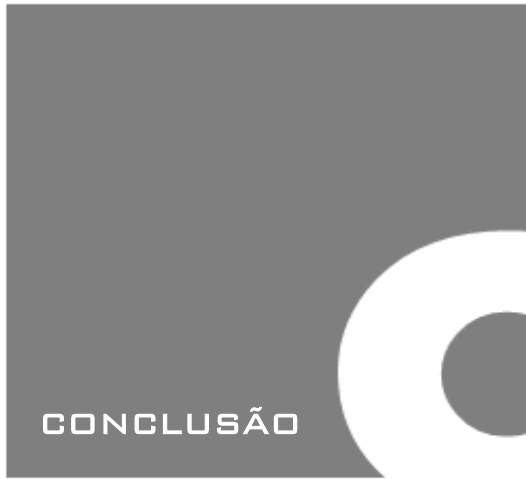
No que diz respeito ao fator de crescimento transformador β (TGF- β), observou-se um aumento da expressão de mRNA no grupo EHNA+Q, e uma redução no EHNA+V (Tabela 6 – Artigo III). O TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na regulação da formação e da degradação da matriz extracelular e, assim, o processo fibrótico¹⁹⁹. É considerado um inibidor potente da proliferação em células epiteliais e atua como um supressor de tumores²¹¹, sendo que neste estudo parece sofrer uma queda, precisamente no período em que ocorre um aumento significativo no desenvolvimento de fibrose hepática (Tabela 3 – Artigo III).

A metaloprotease de matriz-9 (MMP-9) do fígado é uma molécula envolvida na remodelação do processo de fibrogenese²¹². As MMPs são geralmente expressas em níveis baixos em tecidos normais, mas sob certas condições fisiológicas e patológicas, elas encontram-se aumentadas²¹³. Os resultados neste trabalho mostram um aumento significativo na expressão de MMP-9 no grupo EHNA+V (Tabela 3 - Artigo III) e uma diminuição significativa nos grupos tratados (EHNA+Q). Ficou bem estabelecido que as variações de expressão de MMPs estão correlacionadas com a fase fibrótica de doenças hepáticas. Assim, é importante compreender os mecanismos envolvidos na participação das MMPs no decurso de doenças que induzem fibrogenese²¹², por causa do alto risco de progressão para a cirrose e para o carcinoma hepatocelular pela EHNA.

A sobrevivência e os sinais proliferativos disparados durante este processo são transmitidos por uma complexa rede de citocinas e fatores de crescimento agindo de uma forma ordenada. A ativação do receptor de fator de crescimento epidérmico é entendida como um papel importante na regeneração do fígado. Anfirregulina (AREG) é um membro da família do fator de crescimento epidérmico, cuja expressão não é detectável em fígado saudável²¹⁴. Nos grupos EHNA deste estudo, observou-se o aumento da expressão do AREG no fígado (Tabela 3 – Artigo III). A AREG mostra propriedades bifuncionais, estimulando a proliferação de uma variedade de células normais e inibindo a de muitas linhas de células tumorais. Estudos apontam que a expressão da AREG é detectada no fígado de pacientes com cirrose hepática e é rapidamente induzida no fígado de roedores com esteato-hepatite²¹⁴. Neste estudo experimental observou-se uma redução significativa na expressão de AREG nos animais suplementados com quercetina (Tabela 3 – Artigo III), indicando a ação deste flavonóide na proteção hepática na EHNA.

Sendo assim, os resultados obtidos apontam que a quercetina, um antioxidante flavonóide, age na redução da expressão de fatores inflamatórios, bem como nos fatores que

promovem a fibrose do fígado neste modelo. A suplementação de quercetina foi importante para evitar ou, pelo menos, reduzir a progressão de EHNA em camundongos C57BL/6 alimentados com dietas MCD.



CONCLUSÃO

Pelos estudos realizados e dados obtidos nos trabalhos apresentados, concluiu-se que:

No Experimento I:

O modelo experimental de EHNA, utilizando a dieta deficiente de metionina e colina (MCD) desenvolvida nesse experimento, é eficaz, possui fácil aquisição e custos adequados ao nosso centro de investigação.

Apresenta uma efetividade condizente e semelhante às dietas oferecidas no mercado internacional, com boa aceitação pelos animais, bem como, desenvolve as características hepáticas da EHNA: com aspectos morfológicos e histopatológicos semelhantes aos da enfermidade em humanos, aumento significativo das enzimas de integridade hepática e diminuição dos níveis bioquímicos sistêmicos de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL e VLDL. Os animais EHNA apresentaram aumento de lipoperoxidação e da enzima antioxidante glutatona (GSH), validando o modelo experimental.

No Experimento IIa:

A suplementação do flavonóide antioxidante quercetina em camundongos submetidos ao modelo experimental de EHNA, utilizando a dieta deficiente de metionina e colina (MCD), mostrou um decréscimo significativo nas enzimas de função hepática (AST e

ALT), bem como lipoperoxidação diminuída. Também, mostrou menor grau de esteatose macrovesicular, balonização e processo inflamatório no grupo EHNA + Q. O ensaio cometa revelou um aumento significativo nos danos de DNA no fígado dos animais com EHNA em comparação com animais controle. E o grupo EHNA + Q mostrou danos ao DNA significativamente menores do que EHNA não tratado.

No Experimento IIb:

O uso do flavonóide antioxidante Q em camundongos com EHNA através de dieta MCD mostrou um decréscimo significativo nas enzimas de função hepática (AST e ALT), melhorias nas avaliações histopatológicas com menor grau de esteatose macrovesicular e balonização, bem como melhoria no processo inflamatório através da avaliação da expressão de: TNF- α , HMGB1, TLR-4, a COX-2 e JNK e na fibrose pela expressão de CTGF, TGF- β , MMP-9 e AREG no fígado. Isso também é verificado através da redução da ativação de células estreladas através da coloração e identificação positiva de α -SMA.

Em conclusão, os resultados obtidos apontam que a quercetina, um antioxidante flavonóide, age na redução do estresse oxidativo, da expressão de fatores inflamatórios, bem como nos fatores que promovem a fibrose do fígado neste modelo. A suplementação de quercetina foi importante para evitar ou, pelo menos, reduzir a progressão de EHNA em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta MCD. O fato estimula-nos a maiores investigações, visto que, além de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, ela não exerce efeito genotóxico sobre os tecidos estudados.

PERSPECTIVAS
FUTURAS



PERSPECTIVAS FUTURAS

As evidências encontradas neste estudo, bem como as dos diversos estudos publicados sobre o flavonoide quercetina, despertam um grande interesse e abrindo perspectivas de investigar de forma mais aprofundada seus efeitos sobre as células estreladas hepáticas, as quais têm envolvimento vital no desenvolvimento da cirrose e nas conseqüentes complicações sistêmicas. Além disso, viabilizando essas investigações, pode-se prosseguir com estudos envolvendo as modificações da matriz extracelular no processo cirrótico e pesquisar os efeitos da quercetina nesses parâmetros, adentrando, assim, no mundo das metaloproteinases e seus inibidores. Tais estudos poderiam ser realizados em modelo animal ou até mesmo em cultura de células estreladas, fazendo-se um estudo comparativo e verificando-se os efeitos da quercetina nesses mediadores.

Alguns estudos apontam que a EHNA possa levar a um acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático, gerando assim um estresse nessa organela (*unfolded protein response* - UPR)²¹⁵. Essa resposta desencadeia uma cascata de sinalização que inicialmente provoca aumento na capacidade de enovelamento proteico, redução seletiva de tradução no retículo e aumento da degradação de proteínas mal dobradas. Assim, primeiramente há um processo citoprotetor. Esse estímulo prolongado de UPR pode, em condições de estresse, resultar em apoptose^{216, 217}.

Neste contexto, como perspectivas futuras, objetiva-se prosseguir com investigações sobre os efeitos desse flavonoide em níveis moleculares e sua atuação junto ao estresse reticular, bem como, aperfeiçoar a sua forma de administração, sendo essa o maior entrave durante sua utilização, na tentativa de aproximar cada vez mais este estudo da realidade clínica.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
2. Terán Á, Menéndez S, Crespo J. Enfermedad hepática por depósito de grasa. Etiopatogenia, historia natural y tratamiento. *Gastroenterol. Hepatol.* 2011;34:1-11.
3. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005;143:722-8.
4. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*;140:124-31.
5. Bae JC, Cho YK, Lee WY, Seo HI, Rhee EJ, Park SE, Park CY, Oh KW, Sung KC, Kim BI. Impact of nonalcoholic fatty liver disease on insulin resistance in relation to HbA1c levels in nondiabetic subjects. *Am J Gastroenterol*;105:2389-95.
6. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 2004;444:3-12.
7. Zamin JI, Mattos A, Mattos A, Migon E, Soares E, Perry M. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arq. Gastroenterol* 2009;46:69-74.
8. Eriksson S, Eriksson K, Bondesson L. Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition. *Acta Med Scand* 1986;220:83-8.
9. Palmer M, Schaffener F. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. *Gastroenterology* 1990;99:1408-13.

10. London RM, George J. Pathogenesis of NASH: Animal Models. *Clin Liver Dis* 2007;55-74.
11. Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA, Marroni NP. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol* 2011;48:72-9.
12. Brunt E. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2005;33:68-71.
13. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 2009;53:885-92.
14. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *MethEnzimol* 1978;52:302-9.
15. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997;349:699.
16. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33:1061-80.
17. Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res* 2004;35:484-94.
18. Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM, Egado J, Mayoral P, Arevalo MA, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol* 2006;44:2092-100.
19. Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Cakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg* 2006;106:68-72.
20. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, Beecher G, Dwyer JT, Folts J, Harnly J, Hollman P, Keen CL, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G, Burrowes J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 2007;137:718S-737S.
21. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74-80.

22. Galizzi F^o J, Cotrim H, Parise E, Oliveira C. Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Esteato-Hepatite e suas correlações. Yendis, 2011.
23. Freitas L, Cotrim H. Atlas Histológico de Esteato-Hepatite Não Alcoólica - NASH. Zambon, 2006.
24. Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)* 2008;115:141-50.
25. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008;28:339-50.
26. Amarapurkar D, Kamani P, Patel N, Gupte P, Kumar P, Agal S, Baijal R, Lala S, Chaudhary D, Deshpande A. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease: population based study. *Ann Hepatol* 2007;6:161-3.
27. Leevy C. A study of 270 patients with biopsy fatty liver and review of the literature. *Medicine* 1962;41:249-76.
28. Deguti M. Esteato-Hepatite Não Alcoólica: Avaliação Clínica, Histopatológica e Pesquisa de Mutações do Gene HFE. Faculdade de Medicina. Volume Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000.
29. Itoh S, Tsukada Y, Ichinoe A. Nonalcoholic fatty liver with alcoholic hyalin after long-term glucocorticoid therapy. *Acta Hepato-Gastroenterol.* 1977;24:415-8.
30. Diehl A, Goodman Z, Ishak K. alcohollike disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988;95:1056-62.
31. Pinto H, Baptista A, Camilo M, Valente A, Saragoca A, De Moura M. Nonalcoholic steatohepatitis: clinicopathological comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41:172-9.
32. Bacon B, Farakvash M, Janney C, Mneuschwander-Tetri B. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-9.
33. Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C. The epidemiology of fatty liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1087-93.

34. Health UNLoM-NIo. Pubmed: National Center for Biotechnology Information, 2011.
35. Byron D, Minuk G. Profile of an urban hospital-based practice. *Hepatology* 1996;24:813-15.
36. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, St Sauver J, Muto A, Okada T, Lindor K. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology* 2005;41:64-71.
37. Torezan Filho M. Elevação de alanina aminotransferase em doadores de sangue: estudos clínico-epidemiológico, laboratorial e histopatológico. Faculdade de Medicina. Volume Doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999:145.
38. Xiong M, Zhiping L. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Chin. J. Dig. Dis.* 2006;7:7-11.
39. Falck-Ytter Y, Younossi Z, Marchesini G, Mccullough A. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin. Liver Dis.* 2001;21:17-26.
40. Sherlock S, Dooley J. *Doenças do Fígado e do Sistema Biliar*. Guanabara Koogan, 2004.
41. Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, Leite N, Martinelli A, Galizzi J, Silva Rde C, Mattos A, Pereira L, Amorim W, Ivantes C, Souza F, Costa M, Maia L, Pessoa M, Oliveira F. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol* 2011;10:33-7.
42. Ong JP, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, Goodman Z, Younossi ZM. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2005;15:310-5.
43. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007;11:1-16, vii.
44. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:113-21.
45. Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sorensen TI, Becker U, Bendtsen F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut* 2004;53:750-5.

46. Lee RG. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989;20:594-8.
47. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
48. Espera RC, Bermejob JM. Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 2011;54:29-45.
49. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-23.
50. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;134:1682-98.
51. Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:234-8.
52. Cotrim H, Andrade Z, Parana R, Portugal M, Lyra L, Freitas L. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver* 1999;19:299-304.
53. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998;27:1463-6.
54. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
55. Lima V. Esteato-Hepatite Não Alcoólica em camundongos obesos (ob/ob): avaliação do efeito citoprotetor do Yo Jyo Hen Shi Ko. Faculdade de Medicina. Volume Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.
56. Day C, James O. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology* 1998;27:1463-66.
57. McCullough A. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2006;40:17-29.
58. Brunt E. Nonalcoholic Steatohepatitis. *Semin. Liver Dis.* 2004;24:3-20.

59. Brunt E. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Res.* 2005;33:68-71.
60. Neuschwander-Tetri B, Roll F. Chemotactic activity for human PNM generated during ethanol metabolism by rat hepatocytes: role of glutathione and glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;167:1170-6.
61. Yong S, Aisen P. *The liver: Biology and Pathobiology.* Raven Press, 1994.
62. Oliveira C, Faintuch J, Rascovski A, Furuya C, Bastos S. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease. *Obes. Surg.* 2005;15:502-5.
63. Lee K, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2461-8.
64. Tilg H, Moschen A. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010;52 (5):1836-46.
65. Day C. NASH-related liver failure: one hit too many? *Am J Gastroenterol.* 2002;97:2058-62.
66. Bell M, Wang H, Chen H, McLenithan JC, Gong DW, Yang RZ, Yu D, Fried SK, Quon MJ, Londos C, Sztalryd C. Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes* 2008;57:2037-45.
67. Caldwell SH, Chang CY, Nakamoto RK, Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:595-617, x.
68. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008;47:1495-503.
69. Stumvoll M. Thiazolidiones - some recent developments. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2003;12:1179-87.
70. Diehl A, Li Z, Yang S. Cytokines and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005;54:303-306.
71. Farrell G, Larter C. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:99-112.

72. James O, Day C. Nonalcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-6.
73. Lee R. Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis Pathology. American Association for the study of liver diseases, 1998.
74. Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, Lavine JE. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:641-9.
75. Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H. Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:764-74.
76. Farrell GC, Larter CZ, Hou JY, Zhang RH, Yeh MM, Williams J, dela Pena A, Francisco R, Osvath SR, Brooling J, Teoh N, Sedger LM. Apoptosis in experimental NASH is associated with p53 activation and TRAIL receptor expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:443-52.
77. Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W, Shimomura I, Unger RH. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8536-41.
78. Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, Verthier N, Feldmann G, Fromenty B, Pessayre D. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998;114:764-74.
79. Rogers A, Newberne P. Alcoholic and nutritional fatty liver and cirrhosis. *Am J Pathol.* 1973;73:817-20.
80. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996;111:1645-53.
81. de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, de Mello ES, Cerri GG, Carrilho FJ, Caldwell SH. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;49:1055-61.
82. Zeisel SH. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition* 2000;16:669-71.

83. Zeisel SH, da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 2009;67:615-23.
84. Schann BD. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47:654-662.
85. Bremer J, Greenberg DM. Biosynthesis of choline in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1960;37:173-5.
86. Vance JE. Secretion of VLDL, but not HDL, by rat hepatocytes is inhibited by the ethanolamine analogue N-monomethylethanolamine. *J Lipid Res* 1991;32:1971-82.
87. Fast DG, Vance DE. Nascent VLDL phospholipid composition is altered when phosphatidylcholine biosynthesis is inhibited: evidence for a novel mechanism that regulates VLDL secretion. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:159-68.
88. Martinov MV, Vitvitsky VM, Banerjee R, Ataulakhanov FI. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:89-96.
89. Frontiera MS, Stablera SP, Kolhousea F, Allen RH. Regulation of methionine metabolism: Effects of nitrous oxide and excess dietary methionine. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1993;5:28-38.
90. Maio R, Dichi Jb, Burini Rc. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arq. Gastroenterol.* 2000;37:120-124.
91. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
92. Barp J, Araujo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Bello-Klein A, Singal P. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1075-81.
93. Morgan-Martins MI. A Reposição de Estrogênio Diminui o Dano Oxidativo, Aumenta a Atividade das Enzimas Antioxidantes e melhora a Função Cardíaca em Ratas. PPG em Ciência Biológicas: Fisiologia. Volume Tese de Doutorados. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
94. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990;62:670-9.

95. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
96. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-72.
97. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000;33:742-50.
98. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-22.
99. Kozlov AB, Ostrachovitch EA, Afanas'ev IB. Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Biochem Pharmacol* 1994;47:795-9.
100. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
101. Oktyabrsky O, Smirnova G. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)* 2007;72:132-45.
102. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1147-50.
103. Boveris A, Valdez LB, Zaobornyj T, Bustamante J. Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:535-42.
104. Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995;49:345-61.
105. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:143-83.
106. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1005-28.
107. Meneghini RA. Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*. Volume 5. 28 ed, 1987.
108. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992;307:108-12.

109. Yokozawa T, Dong E, Oura H, Kashiwagi H, Nonaka G, Nishioka I. Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy. *Nephron* 1997;75:88-93.
110. Charlton M, Viker K, Krishnan A, Sanderson S, Veldt B, Kaalsbeek AJ, Kendrick M, Thompson G, Que F, Swain J, Sarr M. Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:1375-84.
111. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:823-30.
112. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005;11:183-90.
113. Leclercq IA, Farrell GC, Sempoux C, dela Pena A, Horsmans Y. Curcumin inhibits NF-kappaB activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2004;41:926-34.
114. Yu J, Ip E, Dela Pena A, Hou JY, Sessa J, Pera N, Hall P, Kirsch R, Leclercq I, Farrell GC. COX-2 induction in mice with experimental nutritional steatohepatitis: Role as pro-inflammatory mediator. *Hepatology* 2006;43:826-36.
115. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.
116. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-63.
117. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:119-25.
118. Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M. Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia* 2003;46:1618-28.
119. McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I. Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 2004;34:67-79.

120. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006;169:846-60.
121. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2003;38:123-32.
122. Jiang Z, Woda BA, Savas L, Fraire AE. Expression of ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1 in adenocarcinoma of the lung with observations on the expression of these adhesion molecules in non-neoplastic lung tissue. *Mod Pathol* 1998;11:1189-92.
123. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:523-34.
124. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 1991;69:965-8.
125. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
126. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J* 1992;6:2675-83.
127. Pavanato A, Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, Gonzalez-Gallego J, Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2003;48:824-9.
128. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1939-46.
129. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. [Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress]. *Arq Gastroenterol* 2005;42:244-8.
130. Landvik S. Vitamin E from supplements has good bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;80:784-5; author reply 785-6.
131. Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med* 1989;18:592-602.

132. van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:331-42.
133. Maris AF, Assumpcao AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet* 2001;39:137-49.
134. Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996;24:790-5.
135. Plumb GW, Price KR, Williamson G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep* 1999;4:13-6.
136. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999;38:28-34.
137. Hertog MG, Hollman PC. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:63-71.
138. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.
139. Van Hoorn DE, Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB, Van Norren K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol* 2002;451:111-8.
140. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 1993;20:21-9.
141. Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:167-72.
142. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Nutr* 2005;135:2299-304.

143. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27:1265-74.
144. Park C, So HS, Shin CH, Baek SH, Moon BS, Shin SH, Lee HS, Lee DW, Park R. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1287-95.
145. Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol* 1996;48:555-64.
146. Erden Inal M, Kahraman A, Koken T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:536-9.
147. da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Erdtmann B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002;40:941-7.
148. Waters MD, Stack HF, Jackson MA. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat Res* 1999;437:21-49.
149. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 1987;189:103-12.
150. Dearfield KL, Cimino MC, McCarroll NE, Mauer I, Valcovic LR. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat Res* 2002;521:121-35.
151. MacGregor JT, Casciano D, Muller L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat Res* 2000;455:3-20.
152. Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 2000;464:35-40.
153. Tice RR, Furedi-Machacek M, Satterfield D, Udumudi A, Vasquez M, Dunnick JK. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. *Environ Mol Mutagen* 1998;31:113-24.
154. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.

155. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 2000;455:111-27.
156. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 1999;113:203-12.
157. Picada JN, Maris AF, Ckless K, Salvador M, Borisov NNK, Henriques JAP. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutation Research* 2003;539:29-41.
158. Fenech M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005;111:3-32.
159. Newberne Pm, Camargo JIvd, Clark AJ. Choline Deficiency, Partial Hepatectomy and Liver Tumors in Rats and Mice. *Toxicologic Pathology* 1982;10:95-106.
160. Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. HCPA, 1997.
161. Association AVM. AVMA Guidelines on Euthanasia - Formerly Report of the AVNA. AVNA Panel on Euthanasia 2007.
162. Brunt E, Janney C, Bisceglie AD, Neuschwander-Tetri B, Bacon B. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
163. Harrison S, Neuschwander-Tetri B. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004;8:861-79.
164. Kleiner DE, Brunt EM, Natta MV, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *HEPATOLOGY* 2005;41:1313-21.
165. Bucolo G, DAvid H. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1973;19:476.
166. Bergmeyer H. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie 1984;8:141-8.
167. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985;71:241-9.

168. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
169. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10.
170. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
171. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-9.
172. Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 1983;227:534-41.
173. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973;134:707-16.
174. Beutler E, Duran O, Kelly BM. Improved method for determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 1963;61:802-888.
175. Picada JN, Flores DG, Zettler CG, Marroni NP, Roesler R, Henriques JA. DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;114:80-5.
176. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-21.
177. Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Rodrigues G, Borghetti GS, Bassani VL, Picada JN, Marroni NP. The use of Antioxidant Quercetin in Preventing Liver DNA Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences* in press.
178. Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:221-9.
179. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.

180. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-91.
181. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
182. Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 1970;49:99-113.
183. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350-4.
184. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: pathologic features and differential diagnosis. *Semin Diagn Pathol* 2005;22:330-8.
185. Corey KE, Lai M, Gelrud L, Misdraji J, Barlow LL, Zheng H, Andersson K, Thiim M, Pratt DS, Chung RT. Non-High Density Lipoprotein Cholesterol as a Biomarker for Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012.
186. James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-6.
187. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005;33:68-71.
188. Tieppo J, Cuevas MJ, Vercelino R, Tunon MJ, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J. Quercetin administration ameliorates pulmonary complications of cirrhosis in rats. *J Nutr* 2009;139:1339-46.
189. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008;49:1068-76.
190. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *Journal of Hepatology* 2003;40:47-51.
191. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in

- vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
192. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 1994;307:261-71.
 193. Wilms LC, Hollman PC, Boots AW, Kleinjans JC. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res* 2005;582:155-62.
 194. Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 1997;393:223-31.
 195. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 1999;250:273-283.
 196. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:74-9.
 197. Medicina Diagnóstica A. Enzimas hepáticas alteradas: por onde começar a investigar? *Revista Eletrônica Saiba +* 2011;2.
 198. de Alwis N, Day C. Genes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Current Diabetes Reports* 2008;8:156-163.
 199. Day C. From fat to inflammation. *Gastroenterology* 2006;130:207-210.
 200. Valenti L, Fracanzani A, Dongiovanni P. Tumour necrosis factor promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:272-280.
 201. Schwabe R, Brenn D. TNF-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G583-G589.
 202. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009;50:1756-1764.
 203. Berdichevsky Y, Zemel R, Bachmatov L. A novel high throughput screening assay for HCV NS3 serine protease inhibitors. *J Virol Methods* 2003;107:245-255.

204. Andersson B, Wang H, Tracey K. High molility group 1 protein (HMGB-1) stimulates proinflammatory cytokyne synthesis in monocytes. *J Exp Med* 2000;4:565-570.
205. Yu M, Wang H, Tracey K, Yang H. HMGB1 sinals through toll-like receptor (TRL) 4 and TLR2. *Shock* 2006;26:174-9.
206. Yapali S. The Role Of Cox-2 Expression On Steatohepatitis And Fibrosis In Non-Alcoholic Liver Disease. Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2011.
207. Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Miura K, Taura K, De Minicis S, Osterreicher CH, Schnabl B, Seki E, Brenner DA. c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2009;137:1467-1477 e5.
208. Schattenberg J, Singh R, Wang Y, al. e. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2006:163-172.
209. Martinez-Florez S, Gutierrez-Fernandez B, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J Nutr* 2005;135:1359-65.
210. Chiappini F, Barrier A, Saffroy R, Domart MC, Dagues N, Azoulay D, Sebah M, Franc B, Chevalier S, Debuire B, Dudoit S, Lemoine A. Exploration of global gene expression in human liver steatosis by high-density oligonucleotide microarray. *Lab Invest* 2006;86:154-65.
211. Seoane J. Escaping from the TGFb anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 2006;27:2148-2156.
212. D'Amico F, Consolo M, Amoroso A, Skarmoutsou E, Mauceri B, Stivala F, Malaponte G, Bertino G, Neri S, Mazzarino M. Liver immunolocalization and plasma levels of MMP-9 in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatitis C infection. *Acta Histochemica* 2010;112:474-481.
213. Ries C, Petrides P. Cytokine regulation of matrixmetallo-proteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol. Chem.* 1995:345-55.
214. Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005;128:424-32.

215. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher J, Kellum J, Sanyal A. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2008;134:568-76.
216. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2006;4:e423.
217. Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:487-508.



Methionine/Choline Deficient Diet Composition:*Ingredient:*

Sucrose
Corn Starch
Corn Oil
Alphacel Non-Nutritive Bulk
AIN 76 Mineral Mix (composition below)

(below is gm/kg of AIN 76 Mineral Mix):

Calcium Phosphate Dibasic
Sodium Chloride
Potassium Citrate Monohydrate
Potassium Sulfate
Magnesium Oxide
Manganese Carbonate (43-48% Mn)
Ferric Citrate (16-17% Fe)
Zinc Carbonate (70% ZnO)
Cupric Carbonate (53-55% Cu)
Potassium Iodate
Sodium Selenite
Chromium Potassium Sulfate
Sucrose, finely powdered

Dicalcium Phosphate
L-Alanine
L-Arginine Hydrochloride
L-Asparagine Monohydrate
L-Aspartic Acid
L-Cystine
L-Glutamic Acid
Glycine
L-Histidine Hydrochloride
L-Isoleucine
L-Leucine
L-Lysine Hydrochloride
L-Phenylalanine
L-Proline
L-Serine
L-Threonine
L-Tryptophan
L-Tyrosine
L-Valine
DL-alpha-Tocopherol Acetate (250 u/gm)
Vitamin A Palmitate (250,000 u/gm)
Vitamin D3 (400,000 u/gm)

Ethoxyquin

Vitamin Mix

Biotin
D-Calcium Pantothenate
Inositol
Menadione
Niacin
p-Aminobenzoic Acid
Pyridoxine Hydrochloride
Riboflavin
Thiamine Hydrochloride
Vitamin B12 (0.1% trit.)
Ascorbic acid
Corn Starch

Methionine/Choline Control Diet Composition:

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