

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Daniel Silva Moraes

Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos
obesos

Montes Claros
2018

Daniel Silva Moraes

Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e aspectos clínicos das doenças

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Coorientador: Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade

Montes Claros
2018

M827e Moraes, Daniel Silva.
Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos [manuscrito] / Daniel Silva Moraes. – 2018.
45 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos.

Coorientador: Prof. Dr. João Marcus Oliveira Andrade.

1. Sistema renina-angiotensina. 2. Enalapril. 3. Obesidade. 4. Resistência à insulina.
5. Fígado gorduroso. I. Santos, Sérgio Henrique Sousa. II. Andrade, João Marcus Oliveira. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

Catálogo: Biblioteca Central Professor Antônio Jorge.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Professor João dos Reis Canela

Vice-reitor: Professor Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Mesquitas Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres C. L. de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Afrânio Farias de Melo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Felipe Fróes Couto

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Idenílson Meireles Barbosa

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador(a): Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador(a): Luiz Fernando Rezende



MESTRANDO(A): DANIEL SILVA MORAES

TÍTULO DO TRABALHO: "Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

BANCA (TITULARES)

PROF. DR. SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS - ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. JOÃO MARCUS OLIVEIRA ANDRADE - COORIENTADOR

PROFª. DRª. VALÉRIA MAPRA COTA

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROF. DR. MARCUS VINÍCIUS MACEDO DE OLIVEIRA

PROFª. DRª. LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

ASSINATURAS

APROVADA [] REPROVADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Sérgio Henrique pela paciência e por todos os ensinamentos.

Agradeço ao Prof. João Marcus por sempre acreditar em meu potencial e por todas as oportunidades que me proporcionou ao longo de minha carreira acadêmica

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório de pesquisa por ajudarem a carregar diariamente esse fardo da aprendizagem e da pesquisa

Agradeço aos meus amigos da vida por serem irmãos nos bons e maus momentos

E Por fim, agradeço aos meus pais por TUDO

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica decorrente da associação de múltiplos fatores que resultam no acúmulo excessivo de gordura corporal. Representa atualmente um grande problema de saúde pública pela sua abrangência epidemiológica e a associação com outros problemas também muito prevalentes como a hipertensão arterial e diabetes *mellitus* tipo 2. Relaciona-se também à obesidade o desenvolvimento da Síndrome Metabólica decorrente dentre outras causas de um desequilíbrio no Sistema Renina Angiotensina. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do Enalapril sobre a função metabólica e inflamação hepática de camundongos tratados com dieta hiperlipídica. O experimento foi realizado com 32 camundongos Swiss machos (8 semanas de idade) separados igual e aleatoriamente em 4 grupos (n = 8). Os grupos foram divididos em dieta padrão (DP), dieta padrão mais Enalapril (DH+ENAL), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica mais Enalapril (DH+ENAL). Foram feitas mensurações semanais do peso dos animais e consumo alimentar e testes de tolerância à glicose (TTG) e sensibilidade à insulina (TSI), e a ultrassonografia foi usada para avaliação hepática e do “epididymal fat pad”, os animais foram sacrificados por decapitação e coletadas e armazenadas amostras de sangue e tecido. Amostras de fígado foram submetidas a histologia de HE e análise da expressão gênica por RT-PCR. A análise estatística foi feita em *Graph Pad Prism Software* e analisada sob confiança de 95% (P <0,05). Os dados são expressos como a média ± DP. O significado estatístico das diferenças nos valores médios entre os grupos foi avaliado por fator ANOVA ou Test T. Os resultados demonstram uma diminuição do peso após o tratamento com Enalapril, assim como do tamanho do tecido adiposo epididimal (TAE) que foi menor nos grupos tratados com o medicamento. Houve uma tendência para melhor perfil glicêmico nos grupos tratados, com menor glicemia de jejum e recuperação mais rápida aos TTG e TSI. A ecogenicidade hepática e a medida de esteatose foi menor nos grupos que receberam Enalapril. A expressão gênica revelou maior inflamação hepática nos animais que receberam a medicação.

Palavras-chave: Sistema renina-angiotensina; Enalapril; Obesidade; Resistência à insulina; Fígado gorduroso.

ABSTRACT

Obesity is a chronic disease caused by the association of multiple factors that result in excessive accumulation of body fat. It currently represents a major public health problem due to its epidemiological coverage and its association with other very prevalent problems, such as arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus. The development of Metabolic Syndrome is also related to obesity, among other causes of an imbalance in the System Renin Angiotensin. The objective of this study was to analyze the effects of Enalapril on the metabolic function and hepatic inflammation of mice treated with high fat diet. The experiment was performed with 32 male Swiss mice (8 weeks old) equally and randomly divided into 4 groups (n = 8). The groups were divided into standard diet (DP), standard diet plus Enalapril (DH + ENAL), high fat diet (DH) and high fat diet plus Enalapril (DH + ENAL). Weekly measurements of animal weight and feed intake and glucose tolerance (TTG) and insulin sensitivity (TSI) measurements were performed and ultrasound was used for liver and epididymal fat pad evaluation, animals were sacrificed by decapitation and collected and stored blood and tissue samples. Liver samples were submitted to HE histology and gene expression analysis by RT-PCR. The statistical analysis was done in Graph Pad Prism Software and analyzed under 95% confidence ($P < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SD. Statistical significance of differences in mean values between groups was assessed by ANOVA or Test T factor. The results demonstrate a decrease in weight after treatment with Enalapril, as well as the size of epididymal adipose tissue (EAT) which was lower in the treated groups with the medicine. There was a tendency for a better glycemic profile in the treated groups, with lower fasting glucose and faster recovery to TTG and TSI. Hepatic echogenicity and steatosis measurement were lower in the groups receiving Enalapril. Gene expression revealed increased hepatic inflammation in animals receiving the medication.

Keywords: Renin-angiotensin system; Enalapril; Obesity; Insulin resistance; Fatty liver.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG	Angiotensinogênio
Ang II	Angiotensina II
Ang (1-7)	Angiotensina-(1-7)
ASC	Domínio de recrutamento de caspase
AT1	Receptores de angiotensina tipo 1
DAMP's	Padrões moleculares associados a perigo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
IMC	Índice de massa corporal
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH	Esteatohepatite não alcoólica
NEP	Endopeptidases neutras
NLR	Domínio rico em leucina contendo receptores
NOD	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
PAMP's	Padrões moleculares associadas a patógenos
PEP	Prolyl endopeptidases
RI	Resistência a insulina
SM	Síndrome metabólica
SRA	Sistema renina-angiotensina
TAB	Tecido adiposo branco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Sistema renina angiotensina	15
3.2 Síndrome metabólica.....	16
3.3 Resistência à insulina.....	17
3.4 Fígado.....	18
3.5 Enalapril	19
4 PRODUTOS	20
4.1 Artigo 1: Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos	21
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O Enalapril é um medicamento anti-hipertensivo da classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). Na década de 50, as pesquisas de dois médicos brasileiros, Maurício Rocha e Silva e Wilson Teixeira Beraldo, com o veneno obtido a partir da cobra *Bothrops jararaca* levou ao isolamento da substância bradicinina com propriedades hipotensivas, mais tarde essa descoberta viabilizou a síntese do Captopril e demais inibidores de ECA (1, 2). Os inibidores de ECA, além de seu potencial vasodilatador, são considerados o padrão para tratamento de doenças cardiovasculares em doentes renais crônicos. Medicamentos como o Enalapril têm se provado eficientes na melhora da sobrevida de pacientes, diminuição dos problemas causados por hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio e interrompe a progressão de doenças renais crônicas (3). E também desempenham um papel na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e diminuir a resistência à insulina (RI) (4).

Os efeitos do Enalapril na melhora de parâmetros metabólicos estão associados com sua interferência no sistema renina-angiotensina (SRA). Este sistema peptídico hormonal é um importante regulador da pressão arterial e da homeostase eletrolítica renal, porém além do seu papel fisiológico alguns componentes de SRA também estão envolvidos em alterações patológicas da estrutura e função de diversos órgãos através da sua expressão gênica e detecção de resposta inflamatória exacerbada (5, 6). Os efeitos do SRA estão associados com duas vias opostas deste mesmo sistema. Uma delas é a via tida como clássica na qual os principais componentes são o angiotensinogênio (AGT), a ECA, a angiotensina II (Ang II) e os receptores de angiotensina tipo 1 (AT1) que ao serem ativados induzem sinais como vasoconstrição, proliferação celular, retenção de sódio e liberação de aldosterona. O eixo contra regulatório também começa com o AGT e outros componentes mais importantes são a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a angiotensina-(1-7) (Ang (1-7)) e o receptor Mas que apresenta propriedades vasodilatadoras, antiproliferativas, cardioproteção e melhora da função renal (7).

A expressão tecidual do SRA tem impacto direto na patologia da síndrome metabólica (SM), um grupo de achados clínicos que envolve hipertensão arterial, obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e baixo colesterol de lipoproteína de alta densidade (LDL) (8). O primeiro braço apresentado anteriormente do SRA tente a fortalecer alterações

patológicas que levam ao surgimento e manutenção da SM, enquanto que a segunda via tem se comprovado benéfica na prevenção dessas desordens, desempenhando um papel importante na homeostase do metabolismo de glicose e balanço energético. Por sua associação com a SM e com diversas outras morbidades associadas a obesidade o SRA representa importante alvo para intervenção farmacológica o que coloca o Enalapril em destaque justamente por bloquear os efeitos deletérios da via (9, 10).

A maior relevância clínica do Enalapril tem sido observada no tratamento da hipertensão arterial e alguns casos diabetes mellitus tipo 2 (DM2), porém como essas duas doenças geralmente sempre vem acompanhadas de outras complicações principalmente relacionadas a obesidade e SM é imperativo avaliar a relação desse bloqueio farmacológico do SRA no metabolismo de carboidratos, lipídeos e as possíveis alterações metabólicas e estruturais em órgãos chave. Um órgão protagonista no cenário metabólico do organismo é o fígado, que além de ser o principal desintoxicante de substâncias circulantes, ele ainda é um importante sítio de metabolismo, estoque e distribuição de carboidratos, proteínas e lipídeos, desempenhando um papel central na homeostase metabólica (11). A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) é a manifestação hepática da SM e pode ser observada por diferentes tipos de danos no fígado que vão desde esteatose hepática difusa até cirrose e o mais comum a esteatohepatite não alcoólica (NASH) que afeta de 17% a 31% da população em geral (12).

É de primordial importância a busca de estratégias terapêuticas para tratamento e manejo desses agravos tendo em vista ainda que representam grande impacto para a saúde pública. A obesidade persistente desregula os processos metabólicos incluindo a ação da insulina sobre a glicose e conseqüentemente o metabolismo de ácidos graxos livres, o controle da pressão arterial, da glicemia e do nível de gorduras no sangue entra em desequilíbrio. O quadro de obesidade logo levará à SM e esta combinação é um precursor para a DM2 e doenças cardiovasculares (13-16). A epidemiologia e relevância das doenças crônicas não transmissíveis é de grande prevalência no contexto de saúde pública no Brasil. A síndrome metabólica é doença central envolvida na etiopatogênese de várias morbidades crônicas e tem apresentado aumento da incidência no país (17). As doenças cardiovasculares são uma epidemia global, sendo responsáveis por 80% dos gastos em saúde em países pobres e emergentes (18).

O consumo de grandes quantidades de alimentos e nutrientes já foi uma vantagem para a raça humana em um contexto de sobrevivência em que eram comuns grandes períodos de escassez. Porém nos dias atuais, a facilidade de acesso e a alta disponibilidade de alimentos palatáveis e com alto teor calórico, aliado à uma cultura de sedentarismo levaram à obesidade a alcançar um status de epidemia mundial. A consequência é um aumento alarmante das condições patológicas anteriormente citadas (15).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar os efeitos do inibidor de ECA (Enalapril) na função metabólica e inflamação hepática em modelo *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a evolução no ganho de peso corporal e ingestão calórica dos animais durante o período experimental.
- Analisar a perfil glicêmico.
- Analisar esteatose hepática.
- Avaliar a interação entre a via do inflamossoma hepática com a sinalização de ECA2 e UCP2 levando a consequente impacto na inflamação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistema renina-angiotensina

Em 2016 a prevalência de sobrepeso entre adultos (índice de massa corporal (IMC) ≥ 25) no mundo inteiro foi de 39,1% para ambos os sexos (19), este dado justifica uma crescente preocupação mundial com a saúde de quase metade da população por problemas decorrentes do estado de obesidade. Na busca por alternativas de prevenção e tratamento desses problemas muitos pesquisadores têm, nos últimos anos, se dedicado a investigação de sistemas e vias metabólicas do organismo. O Sistema renina-angiotensina é um sistema peptídico-hormonal complexo ativado através de uma cascata enzimática que tem controle sobre a regulação da pressão arterial, homeostasia cardiovascular e metabolismo (20). O angiotensinogênio é o primeiro ponto a partir do qual se desdobrarão as diversas vias do SRA, esta glicoproteína produzida principalmente pelo fígado que o libera na circulação, também pode ser sintetizado por outras células como neurônios e adipócitos. O AGT é clivado pela enzima renina, por sua vez sintetizada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais, esse processo pode ocorrer na circulação ou em alguns órgãos ou tecidos gerando como produto, o decapeptídeo Ang I. A enzima conversora de angiotensina, expressa em vários tecidos, cataboliza a Ang I em um octapeptídeo, a Ang II, este processo ocorre principalmente na rede vascular pulmonar (21). Ang II é a principal molécula efetora de SRA e pode atuar em nível sistêmico ou tecidual agindo através de dois receptores específicos AT1 e AT2, sua ação básica é a de vasoconstrição (20, 22). A partir do AGT podem ser formadas outras angiotensinas como a Ang III, Ang IV, angiotensina-(1-9) e a angiotensina-(1-7), este último é um heptapeptídeo que se destaca por sua função metabólica, sendo responsável por um braço do SRA que promove ações antagônicas às da Ang II. São duas as formas de obtenção da Ang (1-7), sendo a principal através da hidrólise de Ang II pela ECA2 ou diretamente a partir da Ang I por ação das prolyl endopeptidases (PEP) e endopeptidases neutras (NEP). A Ang (1-7) age pela ativação do receptor de proteína G acoplado Mas causando vasodilatação, inibição do crescimento celular e contra regulação dos efeitos Ang II/AT1. Pesquisas recentes têm apontado novos peptídeos do SRA, Ang A e alamandine, como responsáveis por efeitos semelhantes aos da Ang (1-7), atuando através da ativação de receptores MrgD (21). A importância do braço Ang (1-7)/Mas do SRA pode ser observada mediante a deleção gênica do receptor Mas em camundongos FVB/N o que levou a um grave prejuízo no metabolismo de lipídeos e glicose pela extrapolação dos efeitos causados pela

Ang II e total neutralidade da Ang (1-7), levando a aumento do tecido adiposo, altos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, leptina e glicose, piora na sensibilidade à insulina e menor assimilação de glicose pelos adipócitos, esse cenário representa um modelo para a síndrome metabólica (SM) (23).

3.2 Síndrome metabólica

A SM é uma condição clínica caracterizada pela coexistência dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares apresentando uma prevalência mundial de 10% a 40% (24). A hipertensão arterial (≥ 130 mmHg sistólica e ≥ 85 mmHg diastólica); hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL); colesterol HDL reduzido (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres); circunferência abdominal aumentada (específica por população ou país); glicemia de jejum aumentada (> 100 mg/dL) compõem o grupo de sinais que definem a SM (25). Também pode ser observado um estado pró trombótico nos indivíduos com SM resultante de anormalidades nos fatores de coagulação e plaquetas e um estado pró inflamatório devido ao aumento de mediadores inflamatórios em vários tecidos. Todos esses fatores isolados são riscos para doenças cardiovasculares, quando combinados o risco torna se duas vezes maior (26). É na interação entre fatores genéticos e ambientais que se encontra a origem da SM. Por um lado, o desenvolvimento da diabetes tipo 2 e da dislipidemia, bem como a composição corporal (massa muscular e de gordura) são fatores determinados, em partes, pela genética. Estima se aproximadamente 30% - 40% de influência de fatores genéticos na determinação do índice de massa corporal (IMC) e aproximadamente 70% na determinação da distribuição de gordura corporal (27). Por outro lado, o estilo de vida ocidental em que há consumo em excesso de alimentos com alto teor calórico e de ácidos graxos associado ao sedentarismo compõe um estilo de vida que predispõe ao ganho de peso (28). Dessa forma é possível observar um crescimento da prevalência de SM acompanhando o aumento da obesidade (29).

A obesidade é uma doença crônica decorrente da associação de fatores culturais, psicológicos e genéticos, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal resultante do desequilíbrio entre consumo alimentar e gasto energético (30, 31). O estado de obesidade/sobrepeso, assim como a SM, é um importante fator de risco para doenças crônicas e está envolvido na etiologia de muitas complicações como hipertensão arterial, dislipidemia, DM2, osteoartrites, doenças cardiovasculares e vários tipos de neoplasias, além de por si só diminuir a qualidade de vida (32). A relação entre obesidade e SM vai além da simples

associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas. Um número crescente de evidências tem demonstrado que a obesidade leva a um estado inflamatório crônico com a elevação tecidual e circulatória de níveis de enzimas pró inflamatórias, fatores pró coagulantes, citocinas e quimiocinas, o qual contribui para o desenvolvimento de desordens metabólicas (33). Na obesidade ocorre o consequente aumento dos adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) e evidências demonstram que este tecido funciona não apenas como depósito de gordura mas também como órgão endócrino secretando inúmeras substâncias bioativas. O excesso de adiposidade e a disfuncionalidade dessas células leva a um aumento da expressão desses componentes que estão associados com várias doenças e com um processo inflamatório patológico (34, 35). A inflamação crônica tem um papel fundamental na patogênese da obesidade e disfunções metabólicas associadas (33, 36). E a obesidade, por sua vez, pode ser o elemento mais efetivo na origem e condução da SM (37).

3.3 Resistência à insulina

Sendo estabelecida a conexão entre obesidade e SM, soma-se a esta equação a resistência à insulina (RI) e como força motriz e elo de intercessão entre essas patologias encontra-se o SRA (38). A RI é definida como a ineficiência celular em reagir a sinalização da insulina, deste modo o pâncreas secreta insulina normalmente porém as células musculares, adiposas e hepáticas estão resistentes a sensibilização por este hormônio e desta forma são incapazes de assimilar a glicose o que leva à hiperglicemia (39). Níveis aumentados de Ang II são encontrados tanto em pacientes obesos quanto diabéticos (40). Várias evidências apontam para uma forte relação entre a Ang II e a RI por diferentes vias, uma delas é que como agente hipertensivo, a Ang II leva a alterações no fluxo sanguíneo que prejudica a assimilação de glicose mediada por insulina (41). Além disso outros mecanismos são a redução da adiponectina e adiponeogênese (42, 43), inibição da translocação de GLUT4 (44, 45), aumento de espécies reativas de oxigênio (ROX), inflamação (44), e aumento da deposição ectópica de gordura (46). A maioria dos componentes de SRA são encontrados no tecido adiposo, os efeitos da Ang II neste tecido é um ponto chave para a SM, como a indução de crescimento dos adipócitos que pode explicar a alta prevalência de hipertensão arterial nos indivíduos obesos, ou a RI que tende a aumentar também com a obesidade (39, 46-48).

Percebe-se neste ponto uma retroalimentação constante dos efeitos deletérios ao metabolismo e saúde cardiovascular causados pelo eixo ANG/ECA/Ang II/AT1 do SRA na medida em que

a obesidade leva a uma exacerbação da expressão desses componentes em TAB e esses, por sua vez, causam aumento dos adipócitos, RI, hipertensão arterial e SM pela soma dos fatores.

3.4 Fígado

A SM possui ainda manifestações em outros órgãos, dentre eles o fígado, principal órgão metabólico, que sofre com as doenças gordurosas hepáticas não alcoólicas. Esta morbidade é a principal causa de doença hepática ao redor do mundo com prevalência estimada de 25% a 45% na maioria dos estudos, aumentando em paralelo com a obesidade e diabetes, que, por sua vez, apresentam prevalências de 70% a 80% dentro desses grupos (49-51). NAFLD inclui basicamente duas categorias histologicamente definidas que são o fígado gorduroso não alcoólico que é caracterizado por uma esteatose hepática isolada com ou sem inflamação inespecífica moderada e esteatohepatite não alcoólica (NASH), que apresenta como agravante a presença de injúria hepatocelular com ou sem fibrose (52, 53). NASH é uma doença complexa modulada por vários mecanismos metabólicos, genéticos, ambientais e pela microbiota intestinal, é caracterizada como uma infiltração de ácidos graxos nos hepatócitos, acompanhada de inflamação, estresse oxidativo e injúria celular (54, 55). As causas de NASH estão associadas com outras doenças metabólicas (obesidade, DM2, SM). O TAB visceral libera muitas substâncias que desregulam o metabolismo de glicose e lipídeos o que sobrecarrega o fígado e leva a deposição de gordura e surgimento de um ambiente pró inflamatório (56, 57). NASH pode progredir para outras complicações hepáticas mais graves como cirrose e câncer, sendo responsável pela maioria dos transplantes hepáticos e aumento da mortalidade (56).

NAFLD é manifestação hepática da SM e tende a ser a principal causa de transplante hepático nos Estados Unidos em 2020 (58). E de 10% a 25% das pessoas que apresentam NASH tendem a evoluir para cirrose hepática desenvolvendo um quadro semelhante à injúria causada por álcool, porém em indivíduos que não consomem ou consomem poucas bebidas alcoólicas (59-61). Um mecanismo de dois pontos é apontado na gênese da formação de NAFLD/NASH, primeiro a presença de excesso de gordura no fígado induz lipotoxicidade que causa anormalidades mitocondriais e sensibilizam o fígado para um estado pró-inflamatório adicional, que por consequência leva a maior peroxidação lipídica e aumento da geração de ROX (62). Um mecanismo envolvido neste processo e que também está associado com a patogênese da obesidade e indução da RI é o inflamossoma, particularmente o NLRP3

inflamossoma domínio de ligação a nucleotídeos rico em leucina de repetição contendo proteína (NLRP3). Os inflamossomas são multiproteínas citoplasmáticas complexas compostas por proteínas NLR e PYHIN, incluem NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. O NLRP3 inflamossoma é composto por um domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD), rico em leucina contendo receptores (NLR), domínio de pirimidina 3, um adaptador de proteínas associado a apoptose contendo um domínio de recrutamento de caspase (ASC). NLRP3 inflamossoma age como uma plataforma de sinalização de perigo sendo sensível à padrões moléculaes endógenas ou exógenos associadas a patógenos (PAMP's) ou padrões moleculares associados a perigo (DAMP's) (62-66). ROX são uns dos tipos de DAMP's que ativam NLRP3 inflamossoma (62).

3.5 Enalapril

A influência causada pelo SRA na fisiopatologia da obesidade e etiologia da DM2 e SM faz com que os bloqueadores de SRA sejam umas das classes de escolha para o tratamento medicamentoso de hipertensão arterial em pacientes obesos devido a sua ampla gama de benefícios cardiovasculares e efeitos pleiotrópicos (67). A resistência à insulina e o controle da DM2 também são observadas em medicamentos que reduzem a síntese ou ação da Ang II (9). Um exemplo de inibidor de ECA é o Enalapril que apresenta resultados positivos não apenas no controle da pressão arterial mais também no controle da resistência à insulina e atenuação da síndrome metabólica (68).

O Enalapril já tem sido demonstrado como um reversor dos efeitos causados por dieta que induz SM em camundongos. Em pesquisa que analisou as relações hepáticas e renais com suas respectivas vias do citocromo P450 epoxigenase e citocromo P450 omega hidroxilase em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, houve desequilíbrio da via para a formação de ácido 20-hidroxicosatetraenóico que tem uma ação desreguladora no tônus vascular e na inflamação, o desequilíbrio entre esses sistemas paralelos no fígado e rim contribui para a patogênese e progressão da SM. O tratamento com enalapril restaura o equilíbrio ideal entre esses dois sistemas, efeito que não foi alcançado pela metilformina e losartan (69).

4 PRODUTOS

4.1 Produto 1: **Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos**

4.1 PRODUTO 1

Efeito do Enalapril na função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos

Resumo: A obesidade é uma doença crônica decorrente da associação de múltiplos fatores que resultam no acúmulo excessivo de gordura corporal. Representa atualmente um grande problema de saúde pública pela sua abrangência epidemiológica e a associação com outros problemas também muito prevalentes como a hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2. Relaciona-se também à obesidade o desenvolvimento da Síndrome Metabólica decorrente dentre outras causas de um desequilíbrio no Sistema Renina Angiotensina. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do Enalapril sobre a função metabólica e inflamação hepática de camundongos tratados com dieta hiperlipídica. O experimento foi realizado com 32 camundongos Swiss machos (8 semanas de idade) separados igual e aleatoriamente em 4 grupos (n = 8). Os grupos foram divididos em dieta padrão (DP), dieta padrão mais Enalapril (DH+ENAL), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica mais Enalapril (DH+ENAL). Foram feitas mensurações semanais do peso dos animais e consumo alimentar e testes de tolerância à glicose (TTG) e sensibilidade à insulina (TSI), e a ultrassonografia foi usada para avaliação hepática e do “epididymal fat pad”, os animais foram sacrificados por decapitação e coletadas e armazenadas amostras de sangue e tecido. Amostras de fígado foram submetidas a histologia de HE e análise da expressão gênica por RT-PCR. A análise estatística foi feita em Graph Pad Prism Software e analisada sob confiança de 95% (P <0,05). Os dados são expressos como a média ± DP. O significado estatístico das diferenças nos valores médios entre os grupos foi avaliado por fator ANOVA ou Test T. Os resultados demonstram uma diminuição do peso após o tratamento com Enalapril, assim como do tamanho do tecido adiposo epididimal (TAE) que foi menor nos grupos tratados com o medicamento. Houve uma tendência para melhor perfil glicêmico nos grupos tratados, com menor glicemia de jejum e recuperação mais rápida aos TTG e TSI. A ecogenicidade hepática e a medida de esteatose foi menor nos grupos que receberam Enalapril. A expressão gênica revelou maior inflamação hepática nos animais que receberam a medicação.

Palavras-chave: Sistema renina-angiotensina; Enalapril; Obesidade; Resistência à insulina; Fígado gorduroso.

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica decorrente da associação de fatores culturais, psicológicos e genéticos, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (1). A obesidade e o sobrepeso já se configuram como um dos maiores problemas de saúde pública em vários países do mundo, apresentando prevalência mundial de mais de 50%, conforme dados de 2014 (2). O estado de obesidade/sobrepeso é um importante fator de risco para outras doenças crônicas e está envolvido na etiologia de muitas complicações como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), osteoartrites, doenças cardiovasculares e vários tipos de neoplasias, além de por si só diminuir a qualidade de vida (3). A obesidade abdominal está ainda diretamente relacionada à Síndrome Metabólica (SM), condição clínica em que um estado pró-inflamatório proporcionado pelo tecido adiposo levam ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 e consequente aumento do risco de doenças cardiovasculares (4, 5).

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um sistema hormonal complexo ativado através de uma cascata enzimática que tem controle sobre a regulação da pressão arterial e homeostasia cardiovascular (6). Seus principais componentes são o angiotensinogênio (AGT), a renina, as angiotensinas (Ang), as enzimas conversoras de angiotensina (ECA 1 e 2) e os receptores AT1, AT2 e Mas, juntos estes elementos tem ação não apenas circulante mais também apresentam secreção e expressão tecidual (7, 8). A Ang II é o principal componente do SRA, em sua atuação via receptor AT1 destaca se a indução de vasoconstrição (especialmente renal, cerebral e coronariana); retenção renal de sódio e água; hipertrofia do músculo liso e cardiomiócitos; ativação do sistema nervoso simpático; supressão de renina e estimulação da formação de espécies reativas de oxigênio (9). A Ang (1-7), outro peptídeo do SRA, é ativado via receptor Mas e geralmente promove ações antagônicas às induzidas pela Ang II. O aumento dos níveis plasmáticos de Ang (1-7) estão associados a uma atenuação do estado pró-inflamatório do tecido adiposo e melhora nos parâmetros lipídicos e glicídicos (10). O tecido adiposo é um dos que apresentam expressão do SRA, sendo esta tão significativa a ponto de ser considerado um sistema endócrino pois sua influência se estende a outros órgãos e tecidos pela circulação (11). Um problema se encontra na extrapolação dos efeitos do SRA do tecido adiposo resultantes da obesidade, visto que a hipertrofia dos adipócitos leva a uma maior secreção dos componentes do SRA, levando a efeitos patológicos como a SM, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (12). O aumento da atividade da renina plasmática, assim como um maior nível de angiotensinogênio, aldosterona e atividade

da ECA são descritos em associação a Síndrome Metabólica demonstrando a contribuição do SRA, principalmente via Ang II, na etiologia das alterações cardiovasculares e renais associadas a obesidade, além disso alterações em diferentes níveis desse sistema com a insulina estão ligadas ao desenvolvimento da diabetes mellitus tipo II (13).

A influência causada pelo SRA na fisiopatologia da obesidade e etiologia da DM2 e SM faz com que os bloqueadores de SRA sejam umas das classes de escolha para o tratamento medicamentoso de hipertensão arterial em pacientes obesos devido a sua ampla gama de benefícios cardiovasculares e efeitos pleiotrópicos (14). A resistência à insulina e o controle da DM2 também são observadas em medicamentos que reduzem a síntese ou ação da Ang II (10). Um exemplo de inibidor de ECA é o Enalapril que apresenta resultados positivos não apenas no controle da pressão arterial mais também no controle da resistência à insulina e atenuação da síndrome metabólica (15). Na avaliação da expressão hepática e renal do marcador metabólico citocromo P450 que serve de parâmetro para patogêneses relacionadas a SM foi constatado que o Enalapril teve efeito positivo na diminuição deste através da inibição de Ang II e degradação de bradiquinina, revertendo os danos causados por dieta rica em lipídeos em modelo animal (16).

A obesidade e os consequentes problemas originados como a Síndrome Metabólica e a DM2 acabam por criar uma condição crônica em que o SRA tem papel fundamental, a soma desses desajustes tem consequências danosas para o organismo, o que tornam os fármacos bloqueadores de SRA uma alternativa de tratamento que atua em múltiplos fatores do problema. O objetivo deste trabalho é avaliar a função metabólica e inflamação hepática de camundongos obesos tratados com Enalapril.

MÉTODOS

Animais

Para este experimento foram utilizados 32 camundongos machos Swiss com 8 semanas de idade provenientes e alocados no biotério da Universidade Estadual de Montes Claros. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos, dentre os quais dois foram alimentados com dieta padrão (DP) *ad libitum* e os outros dois com dieta hiperlipídica 60% (DH) *ad libitum* por 17 semanas para indução da SM. Após este período iniciou se o tratamento com os seguintes grupos, cada um com 8 animais: dieta padrão sem Enalapril (DP); dieta padrão mais Enalapril (DP+Enal); dieta hiperlipídica sem Enalapril (DH) e dieta

hiperlipídica mais Enalapril (DH+Enal). Foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas claro e escuro) e temperatura (21°C).

Dieta

A dieta padrão é (Purina – Labina®) é composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas e 11% de gordura, com um total de 3,95 Kcal por 1g. A dieta hiperlipídica é produzida com 40,57% de amido de milho, 14% de caseína, 15,5% de amido dextrinizado, 10% de sacarose, 10% de óleo de soja, 5% de celulose e fibra, 3,5% de mix mineral AIN-93 M, 1% de mix vitamínico AIN-93, 0,18% de L-cisteína, 0,25% de bitartarato de colina e 0,0008% de terc-butilhidroquinona, tendo uma composição de 24% de carboidratos, 15% de proteínas e 61% de gordura, representando um total de 5,28 Kcal por 1g de dieta. DH foi preparada e acondicionada de acordo com as determinações da Associação Oficial de Química Analítica (17, 18) e todos os componentes foram adquiridos pela Rhostrer® LTDA (São Paulo, SP, Brasil). Ambas as dietas foram disponibilizadas *ad libitum* durante todo o período de indução de SM e tratamento.

Droga e administração

O Enalapril (Farmácia de manipulação Minas Brasil, Montes Claros, Brasil) foi diluído em água filtrada e administrado por via oral através do uso da técnica de gavagem, na dose de 30mg/kg/dia, todos os dias. Os animais dos grupos de controle sem Enalapril receberam água por gavagem também todos os dias.

Teste de sensibilidade à insulina (TSI) e teste de tolerância à glicose (TTG)

Para TSI foi administrada insulina exógena a 0,75U/kg de peso do animal na região intraperitoneal e em seguida avaliado a os níveis de glicose plasmática por amostras de sangue da cauda dos camundongos nos períodos de tempo de 0, 15, 30 e 60 minutos após a administração. Neste teste os animais foram avaliados em estado alimentado. Para TTG os animais foram mantidos em jejum durante a noite e foi administrado na região intraperitoneal D-glicose na proporção de 2mg/g de peso do animal e avaliados os níveis de glicose nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração. Na aferição da glicemia foi usado glicosímetro padrão.

Mensuração do peso corporal, ingestão alimentar e coleta de tecidos

Os animais foram pesados a cada três dias durante todo o período de indução da SM e tratamento e a ingestão alimentar foi avaliada diariamente. Após o término do tratamento os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, foram coletadas amostras de sangue, tecido adiposo branco (epididimal, subcutâneo, mesentérico e retroperitoneal), tecido adiposo marrom e fígado. Os tecidos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80°C , um fragmento do fígado foi fixado em solução de formaldeído a 10%.

Coloração histológica por hematoxilina e eosina

O tecido hepático fixado em formaldeído a 10% foi desidratado através de uma série de álcool graduada e xileno, em seguida incorporado em parafina. Secções de $5\mu\text{m}$ foram cortadas e preparadas para coloração de hematoxilina e eosina. Imagens foram obtidas a partir de microscopia óptica, microscópio FSX100 Olympus® (Life Science, USA), com aumento de 200X. De cada lâmina corada obtive-se cinco fotos tiradas de campos aleatórios. As imagens foram analisadas com auxílio do software de domínio público Java image processing program Image-J (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). A área de gordura dos hepatócitos (esteatose) foi determinada pela área das gotículas de gordura dividida pela área total da foto em μm^2 .

Ultrassonografia

Uma semana antes da eutanásia dos animais, os mesmos foram avaliados por ultrassonografia para avaliação hepática e do “epididymal fat pad”. Os animais foram imobilizados e avaliados na posição ventral por radiologista treinado, todas as imagens foram realizadas em modo de brilho fundamental (modo B), com otimização do ganho e as configurações de compensação de ganhos de tempo, que foram mantidas constantes durante todo o procedimento, foi usado equipamento de ultrassonografia Medison® (Seoul, South Korea), com transdutor multifrequência linear (7.0 to 12 MHz). O foco acústico foi direcionado para o centro do órgão alvo para mensuração do tamanho (eixo longitudinal) e da ecogenicidade do fígado e da espessura do “epididymal fat pad” (19, 20). Após registradas as imagens do fígado foram salvas em computador e analisadas usando o software de domínio público Java image processing program Image-J (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) com o qual se determinou, arbitrariamente, uma região de interesse (ROI) no parênquima hepático, cobrindo uma área ampla e excluindo se

vasos grandes, na medida do possível. A intensidade média no ROI foi medida e os valores relativos foram comparados (21, 22).

Transcrição reversa e Real Time PCR

O RNA total das amostras de fígado congeladas foi isolado utilizando TRIzol reagente (Invitrogen Corp.®, San Diego, California, USA), tratadas com DNase e transcriptase reversa com M-MLV (Invitrogen Corp.®) e usando random hexamer primers. O gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como endógeno e os alvos ECA2, UCP2, NLRP3 e IL-1 β foram amplificados a partir de cDNA das amostras usando primers específicos e SYBR green reagent (Applied Biosystems®, USA) em uma Plus One platform (Applied Biosystems®). O método comparativo de CT foi aplicado para analisar os níveis de expressão gênica entre os grupos, usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise estatística

Todos os dados foram organizados em planilhas do software Microsoft Excel (2010) (Microsoft®, Redmond, Washington, USA) e em seguida transcritos para GraphPad Prism software (Version 5.0®, San Diego, California, USA) e analisados com 95% de confiança ($p < 0,05$). Foi aplicada a média e desvio padrão para os valores dos cinco animais de cada grupo. One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni ou Test T para amostras não paramétricas seguido de pós teste de Mann-Whitney avaliou a significância estatística das médias entre os grupos do estudo. Para os TSI e TTG foi aplicado Two-Way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni e análise da área sob a curva por One-Way ANOVA ou Test T para amostras não paramétricas seguido de pós teste de Mann-Whitney. Para cálculo da adiposidade foram somados os pesos de todos os TAB e o mesmo corrigido dividindo se pelo peso do animal.

Aprovação ética

Todos os procedimentos e protocolos usados no manejo dos animais seguiram as determinações da Resolução N°879 de 15 de fevereiro de 2008 que dispõe sobre o uso de animais em pesquisas (23). Este trabalho foi analisado como Processo N° 126 pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Montes Claros e aprovado.

RESULTADOS

As 17 semanas do período de indução da obesidade proporcionaram um aumento das médias de peso de 78,25% no grupo alimentado com DH, neste mesmo período os animais alimentados com DP ganharam uma média de 39,11% do seu peso inicial. Após 12 dias de tratamento houve uma redução de 13,2% no peso dos animais DH+ENAL. Durante as 18 semanas de tratamento o peso do grupo DH manteve-se maior durante todo o período, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas durante o período entre os grupos com e sem tratamento porém a análise da área sob a curva demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo DH e DH+ENAL ($p = 0,0028$) (Figura 1.2). Na pesagem dos animais no último dia de tratamento o peso de DH estava 18,9% maior quando comparado ao grupo DH+ENAL, 25,57%, quando comparado ao grupo DP e 30,58% quando comparado ao grupo DP+ENAL. A média de peso dos animais alimentados com dieta hiperlipídica tratados com Enalapril manteve-se aproximadamente semelhante aos dos alimentados com dieta padrão durante o tratamento. O consumo alimentar foi maior nos grupos tratados com Enalapril, sendo que entre os grupos DH e DH+ENAL essa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0305$) (Figura 1.4). A adiposidade foi superior no grupo DH e não houve diferença estatisticamente comprovada entre os grupos tratados e não tratados (Figura 1.5), o mesmo ocorreu para o peso de TAE (Figura 1.6). A aferição do tamanho de TAE por ultrassonografia revelou uma média de tamanho menor para os grupos tratados com

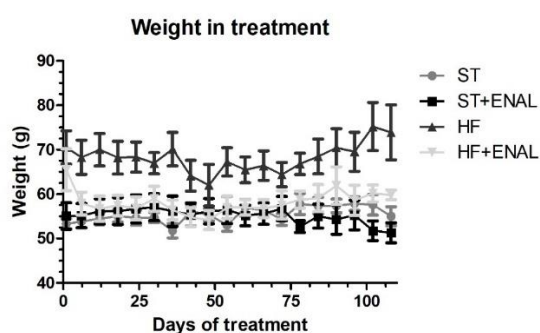


Figura 1: Médias de peso dos animais dos grupos DP, DP+ENAL, DH, DH+ENAL durante o período de tratamento com o Enalapril.

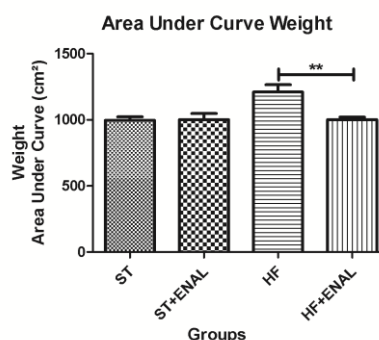


Figura 1.2: Cálculo da área sob a curva da média de peso dos animais dos grupos DP, DP+ENAL, DH, DH+ENAL durante o período de tratamento com o Enalapril. ** $p=0,0028$

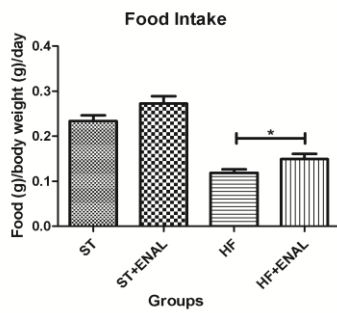


Figura 1.3: Ingestão alimentar média dos camundongos em gramas por grama de peso corporal por dia. *p=0,03

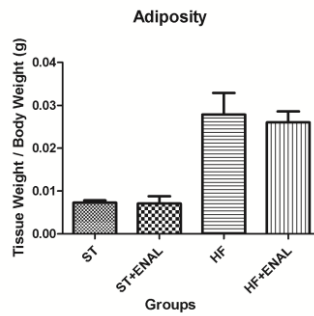


Figura 1.4: Média de peso de TAB dos grupos corrigida pelo peso dos animais em gramas.

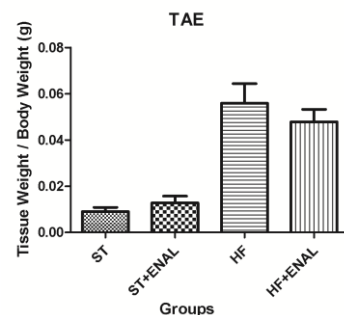


Figura 1.5: Média de peso de TAE dos grupos corrigida pelo peso dos animais em gramas.

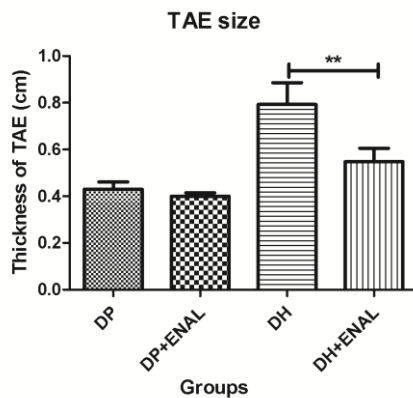


Figura 2: Média da espessura de TAE dos camundongos de cada grupo. **p<0,05

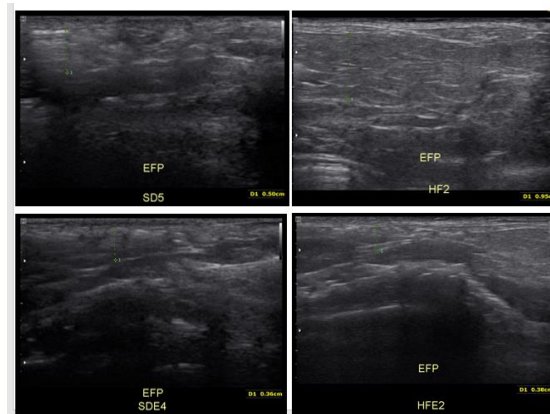


Figura 2.1: Foto da ultrassonografia do “epididymal fat pad” de um animal de cada grupo. DP: canto superior esquerdo, TAE = 0,50 cm. DP+ENAL: Canto inferior esquerdo, TAE = 0,36 cm. DH: canto superior direito, TAE = 0,95 cm. DH+ENAL: canto inferior direito, TAE = 0,38 cm.

Enalapril, havendo diferença estatisticamente comprovada entre os grupos DH e DH+ENAL ($P < 0,05$) (Figura 2, 2.1).

A média de glicemia de jejum dos animais dos grupos tratados com Enalapril foi menor que nos não tratados 111,2 mmg/dL ($\pm 25,29$) e 139,6 mmg/dL ($\pm 25,06$) respectivamente para os grupos DP+ENAL e DH+ENAL contra 156,2 mmg/dL ($\pm 23,22$) e 169,2 mmg/dL ($\pm 33,71$) respectivamente para os grupos DP e DH (Figura 5), esta diferença não foi sensível à análise estatística entre grupos tratados e não tratados, porém entre os grupos DP+ENAL e DH houve confirmação com $p = 0,0371$. No TTG o grupo DP+ENAL manteve os menores valores de glicemia durante todo o teste, o grupo DH+ENAL alcançou o maior valor dentre as médias dos outros grupos no pico após a administração de glicose peritoneal, porém a partir deste ponto sua curva se manteve em decrescente até se igualar ao grupo DP+ENAL no final do teste (Figura 3; 3.1). No TSI os grupos tratados com Enalapril obtiveram os menores níveis de glicemia mantendo se abaixo dos grupos não tratados ao final do teste (Figura 4; 4.1).

O tamanho do eixo longitudinal do fígado avaliado por ultrassonografia não apresentou diferenças consideráveis entre os grupos (Figura 6; 6.1). A ecogenicidade hepática também avaliada por ultrassonografia mostrou maiores médias de escala cinza nos grupos não tratados com Enalapril quando comparados com os grupos tratados que receberam o mesmo tipo de dieta (DP: $34 \pm 16,26$; DP+ENAL: $25,16 \pm 7,92$; DH: $51,24 \pm 10,57$; DH+ENAL: $42,92 \pm 4,43$) (Figura 7; 7.1). O Enalapril foi eficiente na diminuição da esteatose nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, a observação histológica do tecido hepático demonstrou um aumento considerável de gotículas de gordura dispersas no fígado dos animais de DH e uma média estatisticamente significativa menor no grupo DH+ENAL (DH: $2,208\mu\text{m}^2 \pm 0,923$; DH+ENAL: $0,572\mu\text{m}^2 \pm 0,227$; $p = 0,0123$) (Figura 8; 8.1).

A expressão gênica de ECA2 foi inferior no grupo DH e o Enalapril aumentou a expressão deste gene no grupo DH+ENAL, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas (Figura 9.1). O gene UCP2 teve expressão maior no grupo padrão e mínima expressão no grupo DH (Figura 9.2). A expressão de NLRP3 entre os grupos foi a única que apresentou diferenças sensíveis a análise estatística sendo superior no grupo DH+ENAL ($p = 0,0043$ para DP; $p = 0,0173$ para DH) (Figura 9.3). As médias de expressão para IL-1 β foram superiores nos grupos DP e DH+ENAL sem diferença estatística (Figura 9.4).

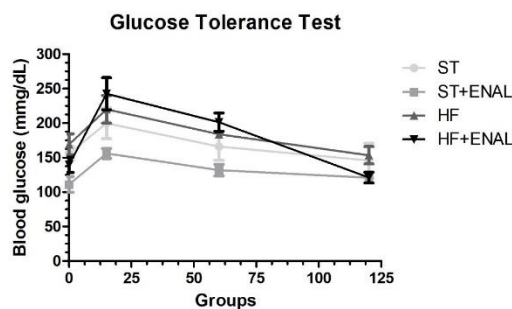


Figura 3: TTG entre os grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL.

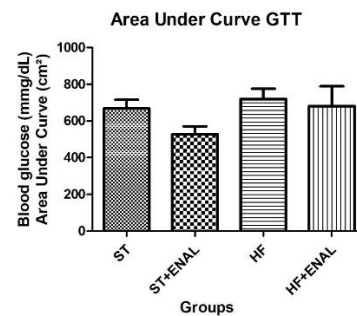


Figura 3.1: Área sob a curva do TTG entre os grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL.

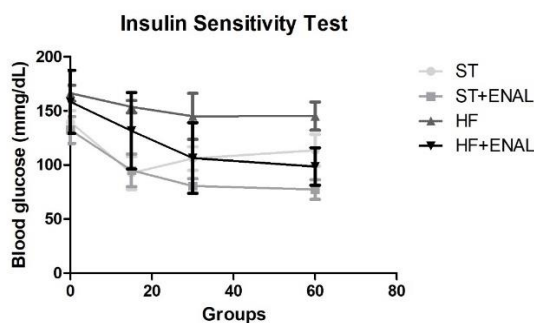


Figura 4: TSI entre os grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL.

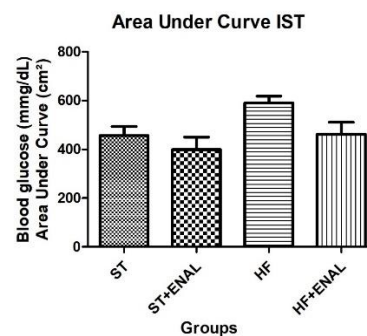


Figura 4.1: Área sob a curva do TSI entre os grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL.

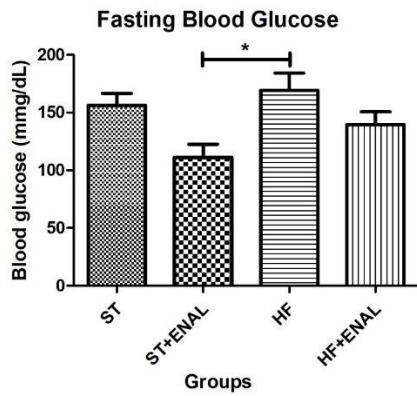


Figura 5: Média da glicemia de jejum dos animais dos grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL. *p=0,0371.

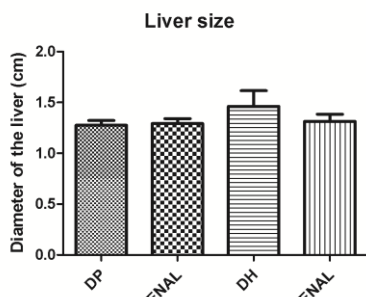


Figura 6: Média do tamanho das aferições do eixo longitudinal hepático dos animais dos grupos DP, DP+ENAL, DH, DH+ENAL.

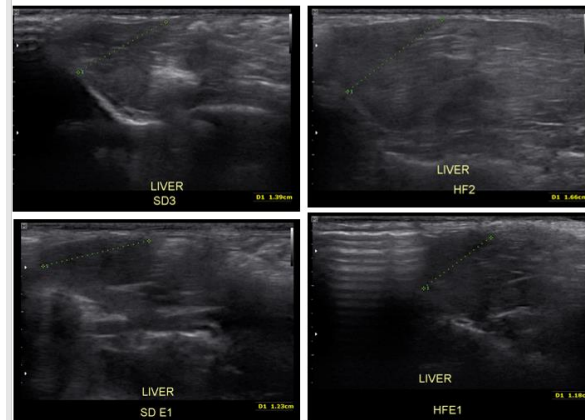


Figura 6.1: Foto da ultrassonografia hepática de um animal de cada grupo. DP: canto superior esquerdo, eixo = 1,39 cm. DP+ENAL: Canto inferior esquerdo, eixo = 1,23 cm. DH: canto superior direito, eixo = 1,66 cm. DH+ENAL: canto inferior direito, eixo = 1,18 cm.

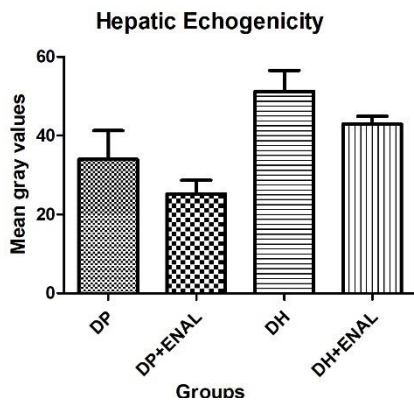


Figura 7: Ecogenicidade hepática. Média das escalas de cinza avaliadas nas fotos de ultrassonografia dos grupos DP, DP+ENAL, DH e DH+ENAL.

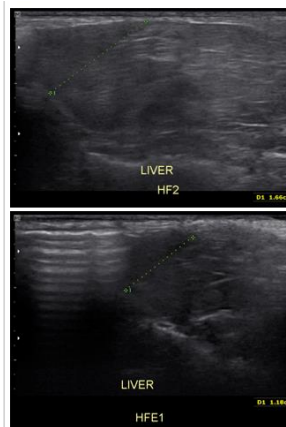


Figura 7.1: Imagem de ultrassom se um animal do grupo DH acima e do grupo DH+ENAL abaixo.

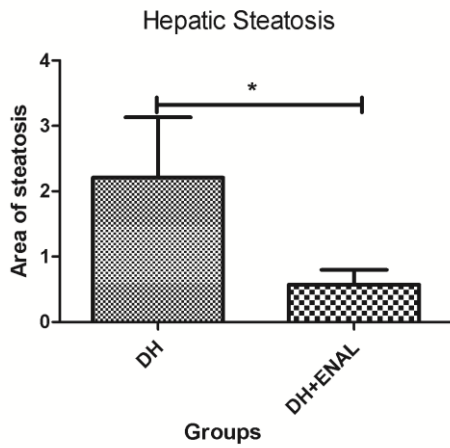


Figura 8: Média das áreas de gotículas de gordura contadas a partir da microscopia dos animais dos grupos DH e DH+ENAL. *p=0,0123

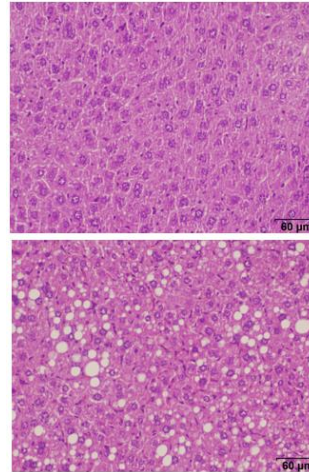


Figura 8.1: Micrografia hepática de animal do grupo DH+ENAL acima e do grupo DH abaixo. Coloração de Hematoxilina e Eosina.

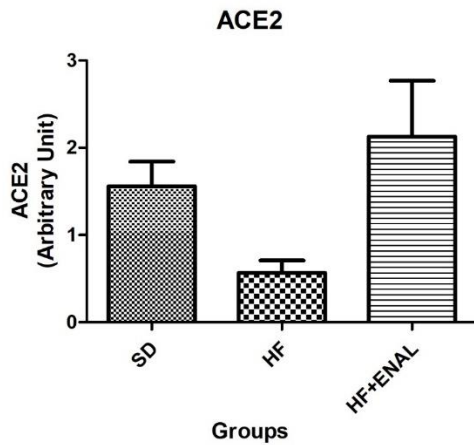


Figura 9.1: Expressão gênica de ECA2 nas amostras de fígado dos animais dos grupos DP, DH e DH+ENAL.

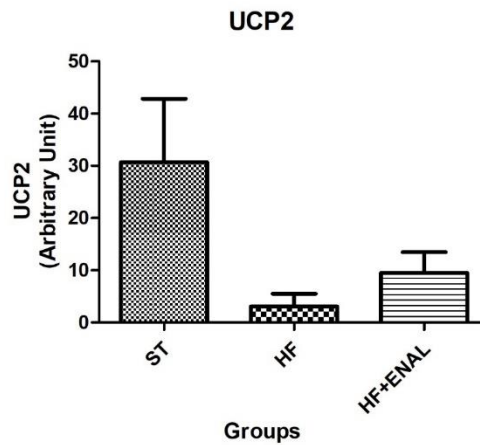


Figura 9.2: Expressão gênica de UCP2 nas amostras de fígado dos animais dos grupos DP, DH e DH+ENAL.

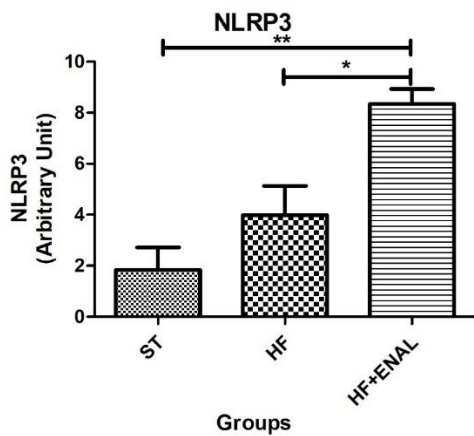


Figura 9.3: Expressão gênica de NLRP3 nas amostras de fígado dos animais dos grupos DP, DH e DH+ENAL. *p= 0,0173; **0,0043.

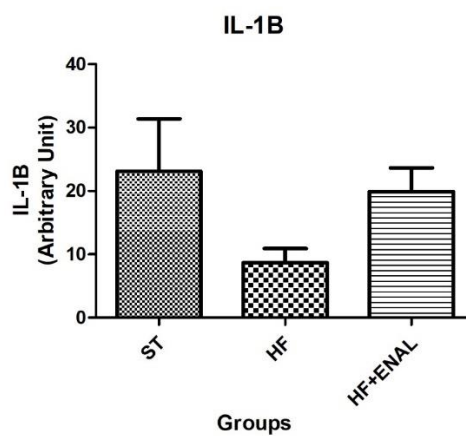


Figura 9.4: Expressão gênica de IL-1β nas amostras de fígado dos animais dos grupos DP, DH e DH+ENAL.

DISCUSSÃO

O modelo animal usado neste estudo reagiu com ganho de peso ao consumir DH e o grupo não tratado com Enalapril manteve o peso superior durante o tratamento. O grupo DH também apresentou uma reação negativa aos TSI e TTG e maior glicemia de jejum quando comparado aos outros grupos. A obesidade e a RI estão quase sempre associadas e existem evidências que as ligam ao SRA. A expressão gênica de ANG e dos outros componentes do SRA é efetivamente presente no tecido adiposo fazendo com que exista uma atividade específica e local deste sistema no tecido. O SRA localmente expresso no tecido adiposo está fortemente associado com a fisiopatologia dos sistemas metabólicos (24). Com a obesidade e o consequente aumento do volume de tecido adiposo pode ocorrer a super expressão de alguns componentes do SRA como a Ang II. Altos valores de Ang II plasmáticos estão associados com a obesidade em humanos e uma maior ativação dos receptores AT1 por este peptídeo é apontada como uma das causas da resistência à insulina associada com obesidade (25, 26). Além disso a Ang II: prejudica a secreção de insulina pelas células β pancreáticas e reduz a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos (27); aumenta a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos enquanto inibe a lipólise no tecido adiposo e músculo esquelético (28); induz a síntese de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina hidrogenase (NADPH) nas células β pancreáticas, o que provoca o aumento do estresse oxidativo nessas células levando as à apoptose (29); induz resposta inflamatória através da ativação do fator nuclear $\text{-k}\beta$ (NF- $\text{k}\beta$) no tecido cardíaco (30).

Existe uma associação entre a obesidade e um estado inflamatório crônico. Em pessoas não obesas os adipócitos secretam substâncias anti-inflamatórias como a interleucina (IL)-10 ou IL-13, ou ainda fatores de sensibilização da insulina (31). No estado de obesidade um aumento de fatores pró-inflamatórios são secretados pelo tecido adiposo e os adipócitos passam a acumular macrófagos levando a uma inflamação local. Nos indivíduos obesos existe uma expressão alta de proteínas pró inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF α) e a proteína quimiotática de monócitos - 1 (MCP-1). Este processo inflamatório crônico tende a resultar em resistência à insulina nos adipócitos o que compromete o metabolismo da glicose e os níveis glicêmicos (32). Além disso, é frequente a ocorrência de doenças cardiovasculares em indivíduos obesos, uma relação estabelecida por diversos fatores dentre eles a associação negativa entre o TNF α e níveis aumentados de colesterol HDL, a hemoglobina glicada e insulina plasmática (33).

Os camundongos tratados com Enalapril reverteram o ganho de peso adquirido com DH mesmo apresentando consumo alimentar superior ao do grupo não tratado e o medicamento também se mostrou efetivo na diminuição dos parâmetros glicêmicos. Já é bem descrito que as ações dos inibidores de ECA não se restringem apenas a diminuição da pressão sanguínea mas também possuem outras ações metabólicas benéficas como a melhora na RI (34, 35), redução do peso e da gordura corporal (36, 37) e da inflamação no tecido adiposo (38).

A aferição do eixo longitudinal hepático não apresentou diferenças consideráveis entre os grupos apesar de um discreto aumento no tamanho do fígado dos camundongos do grupo DH. Porém a avaliação da ecogenicidade hepática que reflete o acúmulo de lipídeos neste órgão e também a medida histológica das gotículas de gordura mostraram uma diminuição considerável da esteatose após o tratamento com Enalapril. A efetividade do medicamento neste propósito se explica em partes pelos efeitos benéficos relatados pela melhor ativação da via ECA2/Ang (1-7)/Mas sobre as NAFLD e outros transtornos metabólicos, como a RI e a perda de peso, melhorando a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose e o DM2, aumentando a produção de adiponectina e revertendo a hiperleptinemia (10, 39-45). O principal problema envolvido na origem da esteatose hepática se relaciona com a RI que causa um desequilíbrio entre a importação e a exportação de gordura para o fígado (46-48). Somam se ainda os fatores pró inflamatórios e pró oxidantes que influenciam na progressão de NAFLD para NASH e cirrose (46, 49, 50). Estudos apontam que o desequilíbrio causado no SRA por condições da obesidade tem sido um fator fundamental nas alterações metabólicas hepáticas de lipídeos observadas em NAFLD pois influenciam, por diversos mecanismos, na sinalização de insulina pelas células causando RI (39, 51). A Ang II também se manifesta como componente negativo deste problema pois ela induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) iniciando e propagando a dispersão de mediadores pró inflamatórios como o TNF- α , a IL-6 e o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) resultando em inflamação e comprometimento adicional da RI. Todo esse processo gera um ciclo de realimentação que inclui a esteatose, inflamação necrótica e fibrose (52, 53).

Outra explicação à condição hepática que se associa com as alterações de excesso de peso e hiperglicemia apresentadas pelo grupo DH, pois a obesidade e a RI aumentam a taxa de lipólise no tecido adiposo e o transporte de ácidos graxos livres para o fígado (54). O aumento da esteatose pode ser resultante do aumento da expressão da proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c), FAS e PPAR- γ , favorecendo a lipogênese *de novo* (55).

O ECA2 é um peptídeo muito expresso em órgãos e tecidos de importância metabólica como o fígado, pâncreas, tecido adiposo e musculo esquelético (56, 57), conseqüentemente

apresenta efeitos protetores tanto pela redução da Ang II quanto pela produção de Ang (1-7) desviando o SRA para a via com resultados metabolicamente benéficos. De fato, a deleção gênica desse eixo por nocaute do receptor Mas leva a um estado semelhante ao da SM em camundongos (40), o que justifica a menor expressão de ECA2 nos animais alimentados com DH nesta pesquisa e sua pior resposta ao metabolismo de glicose. De fato já é bem estabelecido que o SRA apresenta dois eixos com funções contra regulatórias de modo que a via ECA/Ang II/AT1 apresenta ações deletérias principalmente em condições patológicas enquanto que a via ECA2/Ang (1-7)/Mas tende a reestabelecer a condição de homeostase (40, 58-60).

A expressão gênica de UCP2 e NLRP3 seguiram padrões distintos nas análises realizadas, enquanto neste primeiro o grupo padrão manteve superior quando comparado aos outros, no segundo o grupo DH+ENAL foi significativamente superior quando comparado a DH e DP. Já a expressão do IL-1 β foi menor no DH quando comparada aos dois outros grupos, porém sem confirmação estatística. O inflamossoma NLRP3 é o único em sua categoria capaz de identificar padrões moleculares associados a metabólitos do próprio hospedeiro como glicose ou ácidos graxos saturados (61-65). A obesidade pode ser a origem de formação de sinais de perigo, como o aumento de ácidos graxos livres, e por consequência ativar o inflamossoma NLRP3 levando a liberação de sinais inflamatórios como o IL-1 β em pacientes com DM2 ou em modelos animais alimentados com DH (66, 67). Estresse metabólico nas mitocondriais pode gerar disfunções que causam o aumento de ROS e liberação de DNA mitocondrial no citosol (64, 65). Esses são eventos críticos associados à ativação do inflamossoma NLRP3. Apesar de haver vias de ativação independentes da injúria mitocondrial (68, 69). O UCP2 desempenha um importante papel no metabolismo celular como regulador da homeostase e do metabolismo de glicose (70-72) e foi observado que ele afeta a resposta metabólica de camundongos em jejum, influenciando na expressão de enzimas reguladoras de lipídeos e fatores de transcrição (73).

REFERÊNCIAS

1. Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA, Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *Journal of translational medicine*. 2015 Jan 27;13:31. PubMed PMID: 25622596. Pubmed Central PMCID: 4314800.

2. Prevalence of overweight among adults, BMI \geq 25, crude, Estimates by World Bank income group [Internet]. 2018. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.BMI25CWBv?lang=en>.
3. Prevention CoDCa. Overweight and Obesity; Defining Overweight and Obesity 2015. Available from: <http://www.cdc.gov/obesity/defining.html>.
4. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C, American Heart A, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8. PubMed PMID: 14744958.
5. Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2007 May;17(4):319-26. PubMed PMID: 17110092.
6. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2002 Jan 24;89(2A):3A-9A; discussion 10A. PubMed PMID: 11835903.
7. Genest J, Boucher R, De Champlain J, Veyrat R, Chretien M, Biron P, et al. Studies on the Renin-Angiotensin System in Hypertensive Patients. *Canadian Medical Association journal*. 1964 Jan 25;90:263-8. PubMed PMID: 14111732. Pubmed Central PMCID: 1922505.
8. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993 May;87(5 Suppl):IV7-13. PubMed PMID: 8485836.
9. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *American journal of hypertension*. 2000 Jan;13(1 Pt 2):31S-8S. PubMed PMID: 10678286.
10. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 May;30(5):953-61. PubMed PMID: 20203301.
11. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988 Jun;77(6 Pt 2):I4-13. PubMed PMID: 3286045.
12. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003 Jun;35(6):807-25. PubMed PMID: 12676168.
13. Luther JM, Brown NJ. The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis. *Trends in pharmacological sciences*. 2011 Dec;32(12):734-9. PubMed PMID: 21880378. Pubmed Central PMCID: 3223326.
14. de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & behavior*. 2010 Jul 14;100(5):525-34. PubMed PMID: 20381510. Pubmed Central PMCID: 2886177.
15. Goodman LS GA, Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 12 ed2012.
16. Theken KN, Deng Y, Schuck RN, Oni-Orisan A, Miller TM, Kannon MA, et al. Enalapril reverses high-fat diet-induced alterations in cytochrome P450-mediated eicosanoid metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012 Mar 1;302(5):E500-9. PubMed PMID: 22185841. Pubmed Central PMCID: 3311291.
17. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecular aspects of medicine*. 2011 Jun;32(3):159-221. PubMed PMID: 21840335.

18. White JV, Guenter P, Jensen G, Malone A, Schofield M, Academy Malnutrition Work G, et al. Consensus statement: Academy of Nutrition and Dietetics and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2012 May;36(3):275-83. PubMed PMID: 22535923.
19. Fernandez-Dominguez I, Echevarria-Uraga JJ, Gomez N, Luka Z, Wagner C, Lu SC, et al. High-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of non-alcoholic fatty liver disease progression in mice. *Ultrasound in medicine & biology*. 2011 Jul;37(7):1161-9. PubMed PMID: 21645964. Pubmed Central PMCID: 3118979.
20. Liao AH, Ma WC, Wu MF. Evaluation of ultrasound combined with chitosan for the control of weight and local fat in mice. *Ultrasound in medicine & biology*. 2013 Oct;39(10):1794-803. PubMed PMID: 23859895.
21. Kuroda H, Kakisaka K, Kamiyama N, Oikawa T, Onodera M, Sawara K, et al. Non-invasive determination of hepatic steatosis by acoustic structure quantification from ultrasound echo amplitude. *World journal of gastroenterology*. 2012 Aug 7;18(29):3889-95. PubMed PMID: 22876042. Pubmed Central PMCID: 3413062.
22. Miyata Y, Miyahara T, Moriyasu F. Decreased accumulation of ultrasound contrast in the liver of nonalcoholic steatohepatitis rat model. *World journal of gastroenterology*. 2011 Oct 7;17(37):4191-8. PubMed PMID: 22072850. Pubmed Central PMCID: 3208363.
23. RESOLUÇÃO Nº 879, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2008, Stat. 879 (2008).
24. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1270-7. PubMed PMID: 10856276.
25. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001 Dec;15(14):2727-9. PubMed PMID: 11606482.
26. Cooper R, Forrester T, Ogunbiyi O, Muffinda J. Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. *ICSHIB Investigators. Journal of hypertension*. 1998 May;16(5):571-5. PubMed PMID: 9797167.
27. Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. 1997 Apr;138(4):1512-9. PubMed PMID: 9075710.
28. Goossens GH, Blaak EE, Saris WH, van Baak MA. Angiotensin II-induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jun;89(6):2690-6. PubMed PMID: 15181043.
29. Chu KY, Leung PS. Angiotensin II in type 2 diabetes mellitus. *Current protein & peptide science*. 2009 Feb;10(1):75-84. PubMed PMID: 19275674.
30. Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000 Sep;212(1-2):155-69. PubMed PMID: 11108147.
31. Nguyen MT, Favelukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Nov 30;282(48):35279-92. PubMed PMID: 17916553.

32. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007 Jan;56(1):16-23. PubMed PMID: 17192460.
33. Das UN. A perinatal strategy to prevent coronary heart disease. *Nutrition*. 2003 Nov-Dec;19(11-12):1022-7. PubMed PMID: 14624957.
34. Higashiura K, Ura N, Takada T, Li Y, Torii T, Togashi N, et al. The effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist on insulin resistance in fructose-fed rats. *American journal of hypertension*. 2000 Mar;13(3):290-7. PubMed PMID: 10777034.
35. Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Teachey MK, Krekler M. Selective angiotensin II receptor antagonism reduces insulin resistance in obese Zucker rats. *Hypertension*. 2001 Oct;38(4):884-90. PubMed PMID: 11641303.
36. Santos EL, de Picoli Souza K, Guimaraes PB, Reis FC, Silva SM, Costa-Neto CM, et al. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *International immunopharmacology*. 2008 Feb;8(2):247-53. PubMed PMID: 18182235.
37. Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiology & behavior*. 2009 Aug 4;98(1-2):192-7. PubMed PMID: 19465040.
38. Premaratna SD, Manickam E, Begg DP, Rayment DJ, Hafandi A, Jois M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reverses diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation in C57BL/6J mice. *International journal of obesity*. 2012 Feb;36(2):233-43. PubMed PMID: 21556046.
39. Feltenberger JD, Andrade JM, Paraiso A, Barros LO, Filho AB, Sinisterra RD, et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Hypertension*. 2013 Aug;62(2):324-30. PubMed PMID: 23753417.
40. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):340-7. PubMed PMID: 18025412.
41. Santos SH, Andrade JM, Fernandes LR, Sinisterra RD, Sousa FB, Feltenberger JD, et al. Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kappaB in rats fed with high-fat diet. *Peptides*. 2013 Aug;46:47-52. PubMed PMID: 23714175.
42. Santos SH, Simoes e Silva AC. The therapeutic role of Renin-Angiotensin System blockers in obesity-related renal disorders. *Current clinical pharmacology*. 2014 Feb;9(1):2-9. PubMed PMID: 23270435.
43. Bilman V, Mares-Guia L, Nadu AP, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, et al. Decreased hepatic gluconeogenesis in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Peptides*. 2012 Oct;37(2):247-51. PubMed PMID: 22902596.
44. Mario EG, Santos SH, Ferreira AV, Bader M, Santos RA, Botion LM. Angiotensin-(1-7) Mas-receptor deficiency decreases peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in adipocytes. *Peptides*. 2012 Jan;33(1):174-7. PubMed PMID: 22119778.
45. Moreira de Macedo S, Guimaraes TA, Feltenberger JD, Sousa Santos SH. The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides*. 2014 Dec;62:189-96. PubMed PMID: 25453980.

46. Duseja A, Singh SP, Saraswat VA, Acharya SK, Chawla YK, Chowdhury S, et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome-Position Paper of the Indian National Association for the Study of the Liver, Endocrine Society of India, Indian College of Cardiology and Indian Society of Gastroenterology. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015 Mar;5(1):51-68. PubMed PMID: 25941433. Pubmed Central PMCID: 4415196.
47. Baran B, Akyuz F. Non-alcoholic fatty liver disease: what has changed in the treatment since the beginning? *World journal of gastroenterology*. 2014 Oct 21;20(39):14219-29. PubMed PMID: 25339808. Pubmed Central PMCID: 4202350.
48. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1183-92. PubMed PMID: 11266382.
49. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006 May;23(5):469-80. PubMed PMID: 16681555.
50. Milic S, Mikolasevic I, Krznicaric-Zrnica I, Stanic M, Poropat G, Stimac D, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: emerging targeted therapies to optimize treatment options. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:4835-45. PubMed PMID: 26316717. Pubmed Central PMCID: 4548724.
51. Prasad A, Quyyumi AA. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11):1507-12. PubMed PMID: 15364819.
52. Gitto S, Vitale G, Villa E, Andreone P. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis in adults: present and future. *Gastroenterology research and practice*. 2015;2015:732870. PubMed PMID: 25866507. Pubmed Central PMCID: 4381725.
53. Kanno K, Tazuma S, Chayama K. AT1A-deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCl(4). *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 Aug 15;308(1):177-83. PubMed PMID: 12890498.
54. Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1455-62. PubMed PMID: 22522614. Pubmed Central PMCID: 3357298.
55. Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science*. 2009 Apr;116(7):539-64. PubMed PMID: 19243311.
56. Bindom SM, Hans CP, Xia H, Boulares AH, Lazartigues E. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes*. 2010 Oct;59(10):2540-8. PubMed PMID: 20660625. Pubmed Central PMCID: 3279528.
57. Takeda M, Yamamoto K, Takemura Y, Takeshita H, Hongyo K, Kawai T, et al. Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. *Diabetes*. 2013 Jan;62(1):223-33. PubMed PMID: 22933108. Pubmed Central PMCID: 3526031.
58. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9. PubMed PMID: 10969042.

59. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine*. 2007 Nov;13(11):1324-32. PubMed PMID: 17952090.
60. Silva AR, Aguilar EC, Alvarez-Leite JI, da Silva RF, Arantes RM, Bader M, et al. Mas receptor deficiency is associated with worsening of lipid profile and severe hepatic steatosis in ApoE-knockout mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013 Dec;305(11):R1323-30. PubMed PMID: 24089374.
61. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 2006 Mar;24(3):317-27. PubMed PMID: 16546100.
62. Jin C, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Journal of clinical immunology*. 2010 Sep;30(5):628-31. PubMed PMID: 20589420.
63. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nature immunology*. 2010 Oct;11(10):897-904. PubMed PMID: 20835230. Pubmed Central PMCID: 3103663.
64. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews Immunology*. 2010 Mar;10(3):210-5. PubMed PMID: 20168318.
65. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology*. 2010 Feb;11(2):136-40. PubMed PMID: 20023662.
66. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 2011 Feb;17(2):179-88. PubMed PMID: 21217695. Pubmed Central PMCID: 3076025.
67. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature immunology*. 2011 May;12(5):408-15. PubMed PMID: 21478880. Pubmed Central PMCID: 4090391.
68. Kanneganti TD, Lamkanfi M. K(+) drops tilt the NLRP3 inflammasome. *Immunity*. 2013 Jun 27;38(6):1085-8. PubMed PMID: 23809157.
69. Allam R, Lawlor KE, Yu EC, Mildenhall AL, Moujalled DM, Lewis RS, et al. Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic caspase-8 is required for inflammasome priming. *EMBO reports*. 2014 Sep;15(9):982-90. PubMed PMID: 24990442. Pubmed Central PMCID: 4198042.
70. Diano S, Matthews RT, Patrylo P, Yang L, Beal MF, Barnstable CJ, et al. Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology*. 2003 Nov;144(11):5014-21. PubMed PMID: 12960023.
71. Andrews ZB, Horvath B, Barnstable CJ, Elsworth J, Yang L, Beal MF, et al. Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005 Jan 5;25(1):184-91. PubMed PMID: 15634780.
72. Zhang J, Khvorostov I, Hong JS, Oktay Y, Vergnes L, Nuebel E, et al. UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *The EMBO journal*. 2011 Nov 15;30(24):4860-73. PubMed PMID: 22085932. Pubmed Central PMCID: 3243621.

73. Sheets AR, Fulop P, Derdak Z, Kassai A, Sabo E, Mark NM, et al. Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008 Apr;294(4):G1017-24. PubMed PMID: 18292186. Pubmed Central PMCID: 2386270.

5 CONCLUSÕES

O uso do inibidor de ECA Enalapril nesta pesquisa demonstrou ser eficiente na redução do peso e gordura corporal e também foi responsável por uma tendência a melhora do perfil glicêmico dos animais que apresentaram alterações metabólicas induzidas por dieta hiperlipídica. O perfil hepático também foi alterado pelo medicamento com a reversão do quadro de NASH também induzido pela dieta. A expressão reduzida de ECA2 no grupo DH demonstrou uma menor atividade do eixo benéfico do SRA no fígado desses animais enquanto que no grupo DH+ENAL esta atividade foi mais efetiva justamente pelo bloqueio de ECA, entretanto essa sinalização metabólica não se refletiu na expressão do inflamossoma NLRP3 tendo em vista que este gene foi menos expresso no grupo não tratado e consequentemente este também foi o que apresentou menor expressão do marcador inflamatório IL-1 β .

REFERÊNCIAS

1. Ferguson RK, Turini GA, Brunner HR, Gavras H, McKinstry DN. A specific orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme in man. *Lancet*. 1977 Apr 9;1(8015):775-8. PubMed PMID: 66571.
2. Krause MW, Fonseca VA, Shah SV. Combination inhibition of the renin-angiotensin system: is more better? *Kidney international*. 2011 Aug;80(3):245-55. PubMed PMID: 21633407.
3. Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Sep 6;46(5):821-6. PubMed PMID: 16139131.
4. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993 May;87(5 Suppl):IV7-13. PubMed PMID: 8485836.
5. Ganong WF. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1994 Mar;205(3):213-9. PubMed PMID: 8171042.
6. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1993 Jun;87(6):1816-28. PubMed PMID: 8389259.
7. Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2014 Mar;43(1):1-23. PubMed PMID: 24582089.
8. Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *The Journal of endocrinology*. 2013 Feb;216(2):R1-R17. PubMed PMID: 23092879.
9. de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & behavior*. 2010 Jul 14;100(5):525-34. PubMed PMID: 20381510. Pubmed Central PMCID: 2886177.
10. Polyzos SA, Kountouras J, Deretzi G, Zavos C, Mantzoros CS. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Current molecular medicine*. 2012 Jan;12(1):68-82. PubMed PMID: 22082482.
11. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1183-92. PubMed PMID: 11266382.
12. Silva KF, Prata A, Cunha DF. Frequency of metabolic syndrome and the food intake patterns in adults living in a rural area of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44:425-9.
13. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes care*. 1994 Sep;17(9):961-9. PubMed PMID: 7988316.
14. Mensah GA, Mokdad AH, Ford E, Narayan KM, Giles WH, Vinicor F, et al. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiology clinics*. 2004 Nov;22(4):485-504. PubMed PMID: 15501618.
15. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012 Mar 15;302(6):H1219-30. PubMed PMID: 22227126. Pubmed Central PMCID: 3311482.

16. Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *Jama*. 1998 Dec 2;280(21):1843-8. PubMed PMID: 9846779.
17. Yusuf S, Rangarajan S, Teo K, Islam S, Li W, Liu L, et al. Cardiovascular risk and events in 17 low-, middle-, and high-income countries. *The New England journal of medicine*. 2014 Aug 28;371(9):818-27. PubMed PMID: 25162888.
18. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143-421. PubMed PMID: 12485966.
19. Prevalence of overweight among adults, BMI \geq 25, crude, Estimates by World Bank income group [Internet]. 2018. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.BMI25CWBv?lang=en>.
20. Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology*. 2002 Jan 24;89(2A):3A-9A; discussion 10A. PubMed PMID: 11835903.
21. Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2010;50:439-65. PubMed PMID: 20055710.
22. Yayama K, Okamoto H. Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *International immunopharmacology*. 2008 Feb;8(2):312-8. PubMed PMID: 18182246.
23. Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 2008 Feb;57(2):340-7. PubMed PMID: 18025412.
24. Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine*. 2016 May;26(4):364-73. PubMed PMID: 26654259.
25. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Apr;28(4):629-36. PubMed PMID: 18174459.
26. Teran-Garcia M, Bouchard C. Genetics of the metabolic syndrome. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2007 Feb;32(1):89-114. PubMed PMID: 17332787.
27. Han TS, Bijnen FC, Lean ME, Seidell JC. Separate associations of waist and hip circumference with lifestyle factors. *International journal of epidemiology*. 1998 Jun;27(3):422-30. PubMed PMID: 9698130.
28. Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Nov;93(11 Suppl 1):S9-30. PubMed PMID: 18987276.
29. Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA, Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *Journal of translational medicine*. 2015 Jan 27;13:31. PubMed PMID: 25622596. Pubmed Central PMCID: 4314800.
30. Prevention CoDca. *Overweight and Obesity; Defining Overweight and Obesity*. 2015.
31. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7. PubMed PMID: 17167474.
32. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 Oct 1;366(9492):1197-209. PubMed PMID: 16198769.

33. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Current opinion in lipidology*. 2003 Dec;14(6):561-6. PubMed PMID: 14624132.
34. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2005 May 13;96(9):939-49. PubMed PMID: 15890981.
35. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Jul;116(7):1793-801. PubMed PMID: 16823477. Pubmed Central PMCID: 1483173.
36. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):635-43. PubMed PMID: 10766250.
37. Wang CH, Li F, Takahashi N. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *The open hypertension journal*. 2010;3:1-13. PubMed PMID: 21132096. Pubmed Central PMCID: 2995894.
38. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2010 Sep-Oct;77(5):511-23. PubMed PMID: 20960553.
39. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005 Apr;16(3):120-6. PubMed PMID: 15808810.
40. Barrett EJ, Eggleston EM, Inyard AC, Wang H, Li G, Chai W, et al. The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia*. 2009 May;52(5):752-64. PubMed PMID: 19283361. Pubmed Central PMCID: 2704146.
41. Strazzullo P, Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2004 May;13(3):325-32. PubMed PMID: 15073492.
42. Sharma AM, Janke J, Gorzelniak K, Engeli S, Luft FC. Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells. *Hypertension*. 2002 Nov;40(5):609-11. PubMed PMID: 12411451.
43. Shiuchi T, Iwai M, Li HS, Wu L, Min LJ, Li JM, et al. Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension*. 2004 May;43(5):1003-10. PubMed PMID: 15037562.
44. Sloniger JA, Saengsirisuwan V, Diehl CJ, Dokken BB, Lailerd N, Lemieux AM, et al. Defective insulin signaling in skeletal muscle of the hypertensive TG(mREN2)27 rat. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005 Jun;288(6):E1074-81. PubMed PMID: 15657091.
45. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008 Feb;294(2):E345-51. PubMed PMID: 18073321.
46. Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):124-31. PubMed PMID: 20858492.
47. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004 Oct;287(4):R943-9. PubMed PMID: 15191907.
48. Ran J, Hirano T, Fukui T, Saito K, Kageyama H, Okada K, et al. Angiotensin II infusion decreases plasma adiponectin level via its type 1 receptor in rats: an implication for

- hypertension-related insulin resistance. *Metabolism: clinical and experimental*. 2006 Apr;55(4):478-88. PubMed PMID: 16546478.
49. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):2005-23. PubMed PMID: 22488764.
 50. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *The American journal of gastroenterology*. 2012 Jun;107(6):811-26. PubMed PMID: 22641309.
 51. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980 Jul;55(7):434-8. PubMed PMID: 7382552.
 52. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology*. 2015 Apr;62(1 Suppl):S47-64. PubMed PMID: 25920090.
 53. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21. PubMed PMID: 15915461.
 54. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The effect of PNPLA3 on fibrosis progression and development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2014 Mar;109(3):325-34. PubMed PMID: 24445574. Pubmed Central PMCID: 5610907.
 55. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Nov;52(5):1836-46. PubMed PMID: 21038418.
 56. Goodman LS GA, Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. Goodman and Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 12 ed2012.
 57. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama*. 2015 Jun 9;313(22):2263-73. PubMed PMID: 26057287.
 58. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113-21. PubMed PMID: 16012941.
 59. Brunt EM. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in liver disease*. 2002 May;6(2):399-420, vii. PubMed PMID: 12122863.
 60. 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 Jun;116(6):1413-9. PubMed PMID: 10348825.
 61. Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of hepatology*. 2012 Apr;56(4):952-64. PubMed PMID: 22173168.
 62. Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2007 Aug;82(2):259-64. PubMed PMID: 17470531.
 63. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*. 2011;29:707-35. PubMed PMID: 21219188. Pubmed Central PMCID: 4067317.

64. Netea MG, van der Meer JW. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *The New England journal of medicine*. 2011 Jan 6;364(1):60-70. PubMed PMID: 21208109.
65. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20. PubMed PMID: 20303872.
66. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 2011 Feb;17(2):179-88. PubMed PMID: 21217695. Pubmed Central PMCID: 3076025.
67. Theken KN, Deng Y, Schuck RN, Oni-Orisan A, Miller TM, Kannon MA, et al. Enalapril reverses high-fat diet-induced alterations in cytochrome P450-mediated eicosanoid metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012 Mar 1;302(5):E500-9. PubMed PMID: 22185841. Pubmed Central PMCID: 3311291.
68. Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, et al. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 May;30(5):953-61. PubMed PMID: 20203301.
69. Mahady SE, George J. Management of nonalcoholic steatohepatitis: an evidence-based approach. *Clinics in liver disease*. 2012 Aug;16(3):631-45. PubMed PMID: 22824485.