

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**EFEITO DA TAURINA SOBRE A ESTEATOSE HEPÁTICA
INDUZIDA POR TIOACETAMIDA EM *Danio rerio***

Thais Ortiz Hammes

PORTO ALEGRE

2011

Thais Ortiz Hammes

**EFEITO DA TAURINA SOBRE A ESTEATOSE HEPÁTICA
INDUZIDA POR TIOACETAMIDA EM *Danio rerio***

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Ciências em
Gastroenterologia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências em
Gastroenterologia e Hepatologia.**

Orientadora: Profa. Themis Reverbél da Silveira

PORTO ALEGRE

2011

Ortiz Hammes, Thais

Efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio* /
Thais Ortiz Hammes. -- 2011.
117 f.

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de
Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Esteatose Hepática. 2. Taurina. 3. Zebrafish. 4. Tioacetamida. I. Reverbel da Silveira,
Themis, orient. II. Título.

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente e sempre aos pais, amados, por estarem do meu lado não importando o tamanho da empreitada.

À Professora Themis pelo prazer da convivência e pelo carinho quase materno que me dispensou durante esses dois anos.

Aos meus colegas de laboratório por proporcionarem dias mais leves mesmo quando tudo parecia ser chumbo.

Aos meus amigos, todos, por nunca estarem do meu lado nas horas ruins já que com eles as horas sempre ficam alegres.

À Helô e o Pingo pelas conversas, companheirismo e brincadeiras.

Ao Micles pelo companheirismo, carinho e reflexões científicas.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e todos os seus funcionários pela solicitude, competência e bom humor. Em especial, aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental onde esses adjetivos são uma máxima.

Aos colaboradores externos, Rico e Denis, pelos seminários e discussões sobre Zebrafish e taurina.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por ter me proporcionado mais dois anos de ensino gratuito e de qualidade, com o perdão do jargão.

Aos financiadores CAPES, CNPQ e FINE pelo apoio financeiro sem o qual este estudo não seria uma realidade.

Apesar de poesia não ser o meu forte, a objetividade destas palavras não diminuem o meu sentimento. Por isso, do fundo do meu coração, muito obrigada a todos!

RESUMO

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica é uma das formas mais comuns de doença hepática crônica no mundo ocidental. A taurina é um aminoácido que apresenta atividade antioxidante e, por isso, pode ser uma terapia promissora nessa hepatopatia. **Objetivo:** Avaliar o efeito da taurina na esteatose hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*. **Métodos:** Os animais foram divididos em 4 grupos (n=288): controle (Ctrl - 20 µL de solução salina), taurina (TAU - 1000 mg/kg), tioacetamida (TAA - 300 mg/kg) e com coadministração de taurina-tioacetamida (TAU+TAA - 1000 mg/kg + 300 mg/kg). A TAA foi injetado por via intraperitoneal, 3 vezes por semana, durante 2 semanas. A expressão de mRNA, histologia, lipoperoxidação e atividade de enzimas antioxidantes foram avaliadas no tecido hepático e o conteúdo de triglicérides foi medido no soro. **Resultados:** A injeção de TAA induziu esteatose, a qual foi confirmada por métodos histológicos. A lipoperoxidação mostrou ser maior no grupo TAA (0.89 ± 0.06 nmol/mg de proteína) em comparação com o grupo TAU+TAA (0.50 ± 0.01 nmol/mg de proteína) ($P < 0.001$). A atividade da superóxido dismutase (SOD) no grupo TAU+TAA (5.95 ± 0.40 U SOD/mg de proteína) foi aumentada quando comparada com o grupo TAA (4.14 ± 0.18 U SOD/mg de proteína) ($P < 0.001$). A atividade da catalase e os triglicérides séricos não apresentaram alteração. A expressão de mRNA da Sirtuína 1 (0,5 vezes) e do receptor 2 de adiponectina (0,39 vezes) foram menores nos grupos TAA do que no grupo Ctrl ($P < 0.05$). A expressão de mRNA do TNF- α foi 6,4 vezes maior no grupo TAA que no grupo Ctrl. A expressão de Sirtuína1 foi 2,6 vezes maior na TAU+TAA do que no grupo TAA. **Conclusão:** A taurina parece melhorar a esteatose hepática, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a expressão da Sirtuína 1.

ABSTRACT

Background: Nonalcoholic fatty liver disease is one of the most prevalent forms of chronic liver disease in the Western world. Taurine is a amino acid with antioxidants proprieties that may be a promising therapy for treating this disease. **Aim:** To evaluate the effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in *Danio rerio*. **Methods:** Animals were divided into 4 groups (n=288): control (20 µl of saline solution), taurine (1000 mg/kg), thioacetamide (300 mg/kg) and with co-administration of taurine-thioacetamide group (1000 mg/kg plus 300 mg/kg). Thioacetamide was injected intraperitoneally three times a week for 2 weeks. The mRNA expression, lipoperoxidation, antioxidant enzymatic activity and histological analyses were evaluated in the liver and the triglyceride content was assessed in the serum. **Results:** Thioacetamide injection induced steatosis, as indicated by histological analyses. The lipoperoxidation showed significant lipid damage in the thioacetamide group (0.89 ± 0.06 nmol/mg of protein) compared to the taurine-thioacetamide group (0.50 ± 0.01 nmol/mg of protein) ($P < 0.001$). Superoxide dismutase (SOD) activity in the taurine-thioacetamide group (5.95 ± 0.40 SOD/mg of protein) was significantly increased compared to the thioacetamide group (4.14 ± 0.18 U SOD/mg of protein) ($P < 0.001$). The mRNA expression of SIRT1 (0.5-fold) and Adiponectin receptor 2 (0.39-fold) were lower in the thioacetamide group than the control ($P < 0.05$). TNF- α mRNA expression was 6.4-fold higher in the thioacetamide group than control ($P < 0.05$). SIRT1 mRNA expression was 2.6-fold higher in the taurine-thioacetamide group than in the thioacetamide group. **Conclusion:** Taurine seems to improve hepatic steatosis by reducing oxidative stress and increasing SIRT1 expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático das terapias disponíveis para o tratamento de DGHNA e seus principais alvos.....	16
Figura 2 - Aspecto Macroscópico do <i>Danio rerio</i> adulto.	17
Figura 3 - Número de artigos científicos com as palavras-chave “Danio rerio” ou “Zebrafish” na base de referências bibliográficas Web of Science por ano.	18
Figura 4 - Cavidade abdominal do <i>Danio rerio</i> adulto.....	19
Figura 5 - Lobos Hepáticos no Zebrafish.....	20
Figura 6 - Arquitetura hepática de mamíferos e teleósteos.....	21
Figura 7 - Componentes do túbulo hepático e seu ducto exócrino em peixes.	21
Figura 8 - Rede sinusoidal no fígado do Zebrafish.	22
Figura 9 - Metabolismo de ativação da tioacetamida (TAA) no fígado através da enzima CYP2E1.....	29
Figura 10 - Aquários utilizados para os experimentos alocados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.	41
Figura 11 - Método de pesagem dos peixes.	42
Figura 12 - Injeção intraperitoneal do <i>Danio rerio</i> adulto.	43
Figura 13 - Esquema de afixação dos animais para a retirada do fígado.	44
Figura 14 - Procedimento de retirada do sangue dos animais.....	45
Figura 15 - Etapas para retirada do tecido hepático.	45
Figura 16 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre acúmulo hepático de lipídeos.	57
Figura 17 – Aspecto microscópico dos cortes de fígado dos quatro grupos (1000 x).	58
Figura 18 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre os triglicerídeos séricos.	59
Figura 19 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a lipoperoxidação hepática avaliada através de TBARS.....	60
Figura 20 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no tecido hepático.....	61

Figura 21 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a expressão de relativa de mRNA de ADIPOR2 (A), SIRT1 (B) e TNF-α (C).....	62
Figura 22 - Redução tetravalente do oxigênio.....	68
Figura 24- Ação das enzimas antioxidantes.....	69
Figura 25- Efeitos da SIRT1 sobre o metabolismo de lipídeos.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Publicações utilizando Zebrafish como modelo animal para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao fígado.....	27
Tabela 2 - Grupos experimentais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADIPOR1: Receptor 1 de Adiponectina

ADIPOR2: Receptor 2 de Adiponectina

AGL: Ácidos graxos livres

ATP: Trifosfato de Adenosina

CAT: Catalase

cDNA: DNA complementar

CPE-HCPA: Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

C_T – *Threshold cycle*

Ctrl: Controle

CYP1A: Citocromo P4501A

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

Dntp: Deoxinucleotídeos

EF1 α : Fator de alongamento 1 alfa

EPA: United States Environmental Protection Agency

ERC: Ensaio Clínico randomizado

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FAM: 6-carboxifluoresceína

FOXO: *forkhead transcription factor*

GLP-1: *Glucagon-Like peptide-1*

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA: Hidroximetilglutaril Coenzima A

i.p.: intraperitoneal

IKK- β : *I-kappa-B kinase beta*

IMC: Índice de massa corporal

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

L• : Radical lipídicos

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LOO• : Radical peroxila

LOOH: Lipoperóxido

MPO: Mioloperoxidase

mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro.

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

O₂: Oxigênio molecular

O₂⁻: Radical superóxido

OH•: Radical hidroxila

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PGC-1 α : Coativador-1 α do Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos

PPAR: Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos

qRT-PCR: Método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real

RDA - *Recommended Daily Allowance*

RPM: Rotações por minuto

Sir : *Silent Information Regulator*

SIRT1: Sirtuína 1

SOD: Superóxido Dismutase

TAA: Tioacetamida

TASO: Tioacetamida sulfóxido

TASO₂ : Tioacetamida-S,S-dióxido

TAU: Taurina

TAU+TAA: Taurina mais Tioacetamida

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UEA: Unidade de Experimentação Animal

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

SÚMARIO

INTRODUÇÃO	10
Doença hepática gordurosa não alcoólica	10
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	16
Considerações anatômicas e funcionais	19
Metabolismo dos Lipídeos no Zebrafish	24
O Zebrafish como modelo para estudos de doenças hepáticas.....	26
Tioacetamida.....	27
Taurina	30
Considerações Gerais	30
JUSTIFICATIVA.....	36
HIPÓTESE.....	37
OBJETIVOS	38
Objetivo Geral	38
Objetivos Específicos.....	38
MATERIAIS E MÉTODOS	40
Local	40
Animais.....	40
Desenho experimental.....	41
Indução a esteatose.....	41
Tratamento com taurina	41
Preparo das soluções e injeção	42
Grupos experimentais.....	43
Análise Histológica e Histoquímica.....	46
Avaliação do estresse oxidativo.....	47
Preparação do homogeneizado	47
Dosagem de proteína	47
Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	48
Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	48
Atividade da catalase (CAT)	49
Dosagem sérica de Triglicerídeos	50

Análise Molecular	51
Extração do RNA total	51
Síntese de DNA complementar (cDNA).....	52
Quantificação da expressão gênica.	53
Análise Estatística	54
Tamanho da amostra.....	54
Aspectos Éticos	55
RESULTADOS.....	57
DISCUSSÃO	63
A taurina preveniu o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos	64
Estresse oxidativo e taurina.....	66
Efeito da taurina na expressão do mRNA de proteína inflamatórias e do metabolismo de lipídeos.....	71
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS.....	87

INTRODUÇÃO

Doença hepática gordurosa não alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada, atualmente, a forma mais comum de hepatopatia e reconhecida como importante causa para o aumento na morbimortalidade relacionada ao fígado (Sanyal, 2002; Law & Brunt, 2010). A DHGNA é um termo que se refere a um amplo espectro de doenças hepáticas em indivíduos que não consomem álcool em quantidades consideradas danosas ao fígado (American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease, 2002). As lesões na DHGNA iniciam-se geralmente com um quadro de esteatose hepática podendo progredir para esteato-hepatite e até formas mais graves como a cirrose e carcinoma hepatocelular (Lewis & Mohanty, 2010).

A principal característica histológica da DHGNA é o acúmulo de gordura, particularmente de triglicerídeos. O termo “esteatose” originou-se da palavra grega “*stear*”, que significa gordura. A presença de mais de 5% de hepatócitos esteatóticos num corte de fígado é atualmente aceito como o critério mínimo para o diagnóstico histológico de DHGNA (Brunt & Tiniakos, 2010). Na DHGNA existe um predomínio de esteatose macrovesicular com predileção pela região perivenular (zona 3) para o início das lesões, particularmente em adultos. A esteatose severa pode ocupar toda

a extensão do lóbulo. Histologicamente, esta esteatose apresenta grandes gotículas de gordura intracitoplasmáticas que, geralmente, provocam o deslocamento do núcleo (Law & Brunt, 2010).

A obesidade e a resistência à insulina estão intimamente relacionadas ao aparecimento de DHGNA. No entanto, situações como diabetes melito tipo II, perda de peso severa, dislipidemia, obesidade central e síndrome metabólica também se apresentam como causas primárias para o desenvolvimento dessa doença (Abdelmalek & Diehl, 2007; Cusi, 2009; Schuppan *et al*, 2010). Já o aparecimento secundário de DHGNA inclui outros fatores como a exposição à xenobióticos, nutrição parenteral prolongada e algumas intervenções cirúrgicas (transplante hepático e *bypass* jejunoileal) (Abdelmalek & Diehl, 2007).

A prevalência real da DHGNA é desconhecida, pois os estudos geralmente se baseiam em populações de pacientes selecionados (Sanyal, 2002). No entanto, o que parece claro é que a prevalência desta enfermidade vem aumentando nas últimas décadas (Lazo & Clark, 2008). Estima-se que, nos Estados Unidos, a prevalência de esteatose hepática não alcoólica na população em geral seja de 33% (Browning *et al*, 2004). Em presença de obesidade, a prevalência de esteatose hepática varia entre 60 e 95% (de Moura Almeida *et al*, 2008). No Brasil, estudos com biópsia hepática em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica mostraram uma prevalência de 76 – 99% de esteatose hepática dos quais 41 – 56% destes pacientes possuíam esteato-hepatite (Lima *et al*, 2005; Bitencourt *et al*, 2007; de Oliveira *et al*, 2007). Cotrim & colaboradores, em estudo recente, avaliando 1280 indivíduos com diagnóstico de DHGNA, observaram que 44,7% dos indivíduos pesquisados apresentavam índice de massa corporal (IMC) maior que 30 kg/m² e 44,4%, IMC entre 25 e 29,9 kg/m² (Cotrim *et al*, 2011).

Os mecanismos de desenvolvimento de esteatose hepática ainda não estão bem entendidos. Sabe-se que em um fígado saudável, os ácidos graxos livres provenientes da lipólise ou dieta são captados pelo hepatócito e oxidados na mitocôndria ou esterificados em triglicerídeos. Estes triglicerídeos (que também podem ser formados a partir da lipogênese) são exportados para a circulação pela VLDL (*Very low-density lipoprotein*) (Angulo, 2002; Preiss & Sattar, 2008). O excessivo acúmulo de lipídeos nos hepatócitos de pacientes com esteatose parece ocorrer por um desequilíbrio entre a síntese e a exportação e/ou oxidação dos triglicerídeos (Anderson & Borlak, 2008), mais especificamente:

- Diminuição da síntese e secreção de lipoproteínas;
- Aumento da lipólise no tecido adiposo, principalmente o visceral;
- Aumento do fluxo de ácidos graxos livres no hepatócito;
- Alteração β -oxidação nas mitocôndrias do hepatócitos;
- Aumento na lipogênese hepática (Cheung & Sanyal, 2010)

A resistência à insulina, um importante fator de risco para a DHGNA, pode promover a esteatose por diversos mecanismos tais como hiperinsulinemia, aumento de ácidos graxos livres na circulação provenientes da lipólise do tecido adiposo, desequilíbrio na produção de citocinas, entre outros. O aumento da captação destes ácidos graxos pelo hepatócito promove uma sobrecarga na β -oxidação mitocondrial com o conseqüente acúmulo dos ácidos graxos nos hepatócitos e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres (Anderson & Borlak, 2008; Cusi, 2009).

Os motivos pelos quais a esteatose hepática progride à esteato-hepatite, fibrose e hepatocarcinoma permanecem obscuros. Em 1998, Day & James propuseram o modelo de dois *Hits* para tentar explicar por que alguns pacientes permaneciam indefinidamente com esteatose e outros cursavam com esteato-hepatite ou fibrose. Segundo eles, a esteatose seria o primeiro *Hit*, nela o aumento do fluxo de ácidos graxos no fígado, resultante da resistência à insulina, promoveria um quadro de disfunção mitocondrial e ativação de diversos fatores de transcrição intracelulares relacionados à adipogênese hepática e inflamação. Em consequência disso, ocorreria o aumento de espécies reativas de oxigênio, dos níveis de TNF- α e dos requerimentos de ATP – caracterizando o segundo *Hit* (Day & James, 1998; Day, 2002). Recentemente, um terceiro *Hit* foi incluído na tentativa de explicar a progressão do NAFLD: a morte de hepatócitos e a falha no seu mecanismo de reparo (Tiniakos *et al*, 2010).

O preciso mecanismo molecular de progressão da DHGNA permanece desconhecido (Carazo *et al*, 2011). Estudos recentes tem sugerido um possível papel da Sirtuína 1 (SIRT1) sobre a regulação do metabolismo de lipídeos no fígado e em tecidos extra-hepáticos (You *et al*, 2008). A SIRT1 é uma proteína deacetilase NAD⁺-dependente que regula a expressão gênica. Sua ação ocorre através da remoção de grupos acetil dos resíduos de lisina de histonas e de vários fatores de transcrição (Liang *et al*, 2010). No fígado, a SIRT1 medeia a deacetilação do PGC-1 α (Coativador-1 α do Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos γ) - direcionando a um padrão de expressão gênica que favorece a β -oxidação e o gasto energético em detrimento à síntese lipídica.

Animais que superexpressam SIRT1 ou modelos de tratamento com agonistas para SIRT1 revelam um efeito protetor desta proteína frente à DHGNA

(Feige *et al*, 2008; Pfluger *et al*, 2008). Nestes casos, foi observado que esta proteção era exercida pela interação com outras proteínas. Banks & colaboradores observaram que o aumento moderado na expressão de SIRT1 promove elevação nos níveis do mRNA do receptor 2 de adiponectina (ADIPOR2) e esse efeito também é observado em outros trabalhos que utilizaram ativadores de SIRT1 (Banks *et al*, 2008; Feige *et al*, 2008). Além disso, o tratamento de miotúbulos com adiponectina promove o aumento de SIRT1 (Civitarese *et al*, 2007).

A adiponectina é uma proteína produzida largamente por adipócitos que tem um importante papel no desenvolvimento da esteatose. Esta hipótese tem suporte em estudos que demonstram esteatose hepática espontânea em ratos *knockout* para adiponectina (You & Rogers, 2009). A atividade de adiponectina é mediada pelos receptores de adiponectina 1 (ADIPOR1) e 2 (ADIPOR2). O receptor de adiponectina 1 é abundante em músculo esquelético, enquanto que, o ADIPOR2 é predominantemente expresso no fígado (Liang *et al*, 2010). Civitarese & colaboradores, obtiveram bloqueio da ação da adiponectina e redução da expressão de SIRT1 em miotúbulos *knocking-down* para ADIPOR1 e ADIPOR2 (Civitarese *et al*, 2007).

Em oposição aos efeitos hepatoprotetores da adiponectina, encontra-se o TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos que está envolvida na desregulação do metabolismo de lipídeos no fígado. Em indivíduos com DHGNA, um aumento na expressão de TNF- α é observado (Ruiz *et al*, 2007). Maiores níveis de TNF- α também são encontrados em ratos *knockout* para adiponectina em tecido adiposo (Maeda *et al*, 2002). Por outro lado, redução da expressão hepática de TNF- α e superóxido dismutase (SOD) foi observada em animais transgênicos com superexpressão de SIRT1 tratados com

dieta hiperlipídica em relação ao controle não-transgênico com a mesma dieta. Este perfil de expressão foi acompanhado da melhora do padrão histológico de esteatose (Pfluger *et al*, 2008).

O tratamento para DGHNA ainda permanece controverso. Sabe-se que - entre as medidas não-farmacológicas - a perda de peso, isoladamente, reduz o acúmulo de triglicerídeos intra-hepáticos, tanto por dieta quanto exercício físico (Musso *et al*). Dietas com restrição calórica que promovam perda de peso, independente de ter baixo teor de carboidratos ou de lipídeos, reduzem a esteatose hepática. Por outro lado, acredita-se que dietas com alto teor de frutose e ácidos graxos *trans* podem contribuir para o aumento dos triglicerídeos intra-hepáticos mesmo com baixa ingestão calórica total (Machado *et al*, 2010; Sullivan, 2010). Foi visto, que o exercício físico associado à perda de peso ou *per se* reduz significativamente a esteatose hepática e as aminotransferases séricas de indivíduos com DGHNA (Johnson & George, 2010). Apesar dos benefícios da mudança do estilo de vida sobre a regressão DGHNA sabe-se que 50% dos pacientes não conseguem atingir as metas de perda de peso (Musso *et al*, 2010).

Atualmente, não existe consenso sobre as medidas farmacológicas para o tratamento de DGHNA. No entanto, os estudos têm focado os mecanismos alvo da doença na tentativa de encontrar terapias, utilizando, dessa forma, fármacos que promovam a sensibilização à insulina, reduzam a dislipidemia, a inflamação e/ou estresse oxidativo (**Figura 1**) (Oh *et al*, 2008; Musso *et al*, 2010).

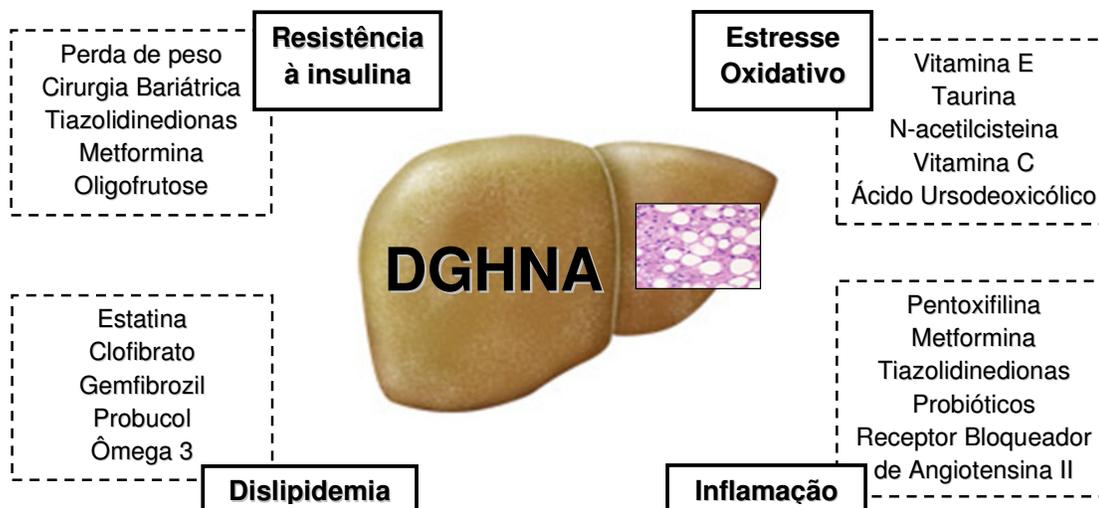


Figura 1 - Desenho esquemático das terapias disponíveis para o tratamento de DGHNA e seus principais alvos.
 Fonte: (Musso *et al*, 2010).

Apesar de sua complexidade, a maior parte dos casos de esteatose hepática podem ser reversíveis se seu fator casual for eliminado. Em contrapartida, a cronicidade da esteatose pode evoluir para graves hepatopatias como a cirrose ou o carcinoma hepatocelular (Hashimoto & Tokushige, 2010).

Zebrafish (*Danio rerio*)

O *Danio rerio* é um peixe onívoro que mede, na vida adulta, de 3 a 4 centímetros de comprimento (**Figura 2**) (Schneider *et al*, 2009). Este peixe de água-doce é nativo da Ásia, mais especificamente na região sudeste do Himalaia. Conhecido popularmente como Zebrafish ou Paulistinha, o gênero *Danio* foi descrito em 1822 por Hamilton como um subgênero de *Cyprinus* – pertencente à família *Cyprinidae*, da ordem dos *Cypriniformes*, classe dos *Actinopterygii*. Mais tarde, a literatura adotou o nome *Brachydanio* para designar um gênero com tamanho menor

e corpo esguio (incluindo o *D. rerio*), já o nome *Danio* ficaria restrito aos peixes maiores. Embora *Brachydanio rerio* seja usado com frequência, o nome *Danio rerio* é atualmente aceito para designar o Zebrafish (Mayden *et al*, 2007).

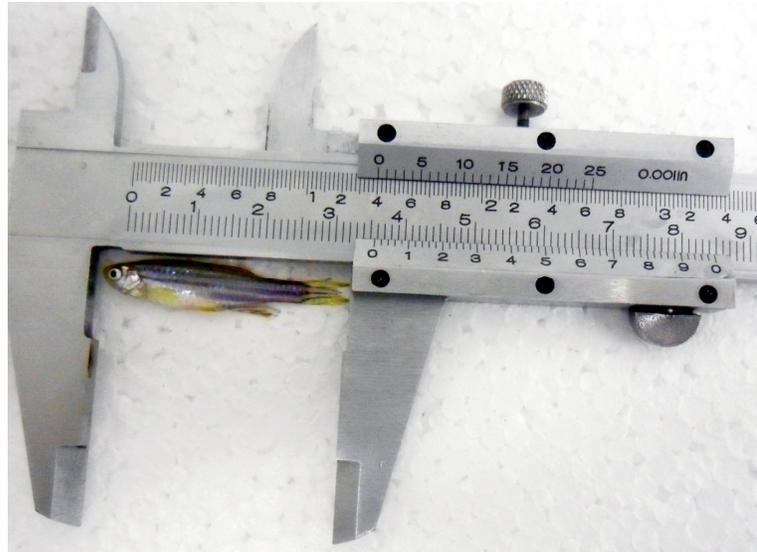


Figura 2 - Aspecto Macroscópico do *Danio rerio* adulto.

Em 1981, o húngaro George Streisinger, da Universidade de Oregon nos Estados Unidos da América, iniciou os primeiros estudos utilizando o *Danio rerio* como modelo para estudos genéticos. Trinta anos depois, as pesquisas utilizando o Zebrafish como modelo experimental aumentaram expressivamente. No ano de 2009 foram publicados mais de dois mil artigos científicos com o termo “Zebrafish” como palavra-chave. Em 1989 – vinte anos antes – apenas sete artigos haviam sido publicados (**Figura 3**).

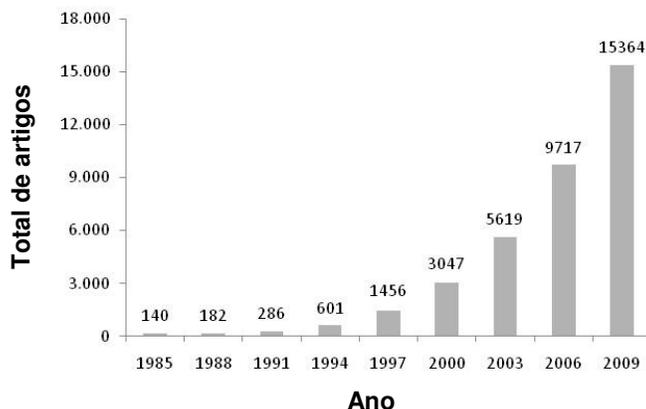


Figura 3 - Número de artigos científicos com as palavras-chave “Danio rerio” ou “Zebrafish” na base de referências bibliográficas Web of Science por ano.

O manejo e manutenção do Zebrafish já estão bem estabelecidos, apresentando baixos custos e necessitando a alocação de menores espaços quando comparados a outros modelos animais tradicionalmente utilizados em pesquisa, como ratos ou camundongos. Além disso, o Zebrafish possui uma prole altamente numerosa o que facilita a reprodução e a obtenção de grande quantidade de animais. Após 96 horas da fertilização o Zebrafish já pode ser comparado a um embrião humano do primeiro trimestre. O desenvolvimento embrionário do Zebrafish é externo à mãe com larvas transparentes - um ótimo modelo para estudos de embriogênese (Parnig *et al*, 2002). Além disso, o Zebrafish tem excelente homologia fisiológica, bioquímica, genética e imunológica com mamíferos (Feijó *et al*, 2010).

Todas estas vantagens são algumas das características responsáveis pela expansão do Zebrafish na experimentação científica. O seqüenciamento do genoma e a facilidade de manipulação genética desta espécie contribuíram para o desenvolvimento de diversas linhagens transgênicas, como o *foie gras* – um Zebrafish com mutação que resulta em esteatose hepática (Chu & Sadler, 2009).

Por todos estes motivos o Zebrafish tem sido largamente utilizado em estudos de embriogênese, carcinogênese, toxicidade e, sobretudo, estudos genéticos (Feijó *et al*, 2010).

Considerações anatômicas e funcionais

O fígado do *Danio rerio* apresenta muitas semelhanças anatômicas e metabólicas com o fígado de mamíferos. Ambos apresentam um órgão encapsulado, com sinusóides, ductos biliares e suprimento sanguíneo por arteríolas hepáticas e veia porta. Apesar disso, o fígado dos peixes é relativamente menor em comparação ao corpo que os mamíferos; eles têm a perfusão hepática reduzida em um quarto e a produção de bile é 50 vezes mais lenta que os mamíferos (**Figura 4**) (Wolf & Wolfe, 2005).

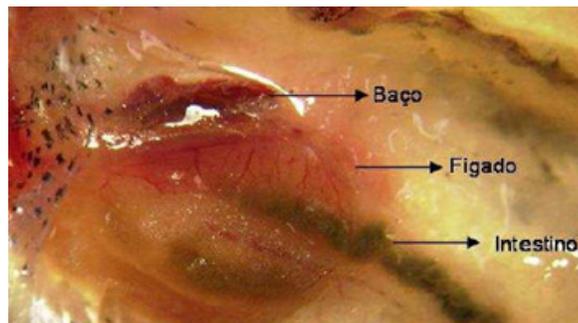


Figura 4 - Cavidade abdominal do Danio rerio adulto.

Fonte: (Schneider *et al*, 2009).

Anatomicamente, o fígado do Zebrafish pode ser dividido em 3 lobos: lobo direito, lobo esquerdo e lobo ventral (**Figura 5**) (Korzhan *et al*, 2008). Os hepatócitos representam de 80 a 90% do volume total do fígado dos peixes e estão arranjados de forma tubular, o que é providencial para função exócrina do fígado. Na superfície da membrana plasmática dos hepatócitos se originam os canalículos biliares – a

porção inicial da árvore biliar intra-hepática. Estes canalículos são revestidos por células epiteliais que constituem a segunda maior população celular do fígado de peixes (Hinton & Couch, 1998). As células de Kupffer não são evidentes na maioria dos peixes (Wolf & Wolfe, 2005).

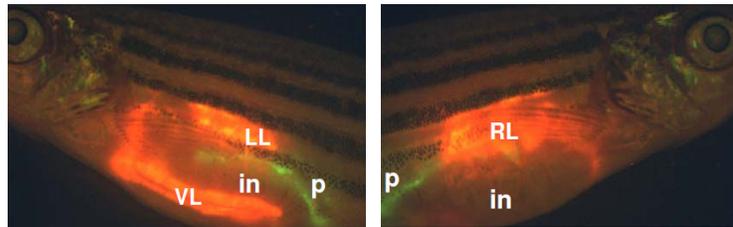


Figura 5 - Lobos Hepáticos no Zebrafish.

O fígado do Zebrafish pode ser dividido anatomicamente em três lobos: lobo direito (RL), lobo esquerdo (LL) e lobo ventral (VL).

Fonte: (Korzhan *et al*, 2008)

No entanto, existem algumas características importantes do fígado de mamíferos que não estão presentes na estrutura hepática dos peixes. Talvez a mais importante delas seja a ausência do clássico lóbulo hepático no formato hexagonal com espaço porta facilmente distinguível. Nos peixes, a veia porta, as artérias hepáticas e os ductos biliares estão distribuídos estocasticamente dentro do parênquima hepático e não agrupado num trato portal, como em mamíferos (Tao & Peng, 2009). O lóbulo dos peixes consiste numa bicamada de hepatócitos arranjados como túbulos, quase cilíndricos, cercados por um endotélio fenestrado, dentro dos quais se localizam pequenos ductos biliares (**Figura 6 e 7**). Estes ductos intra-hepáticos são derivados de canalículos biliares e formam uma rede de canais. A bile é drenada para a vesícula biliar através de ductos maiores e do sistema biliar extra-hepático (Lorent *et al*, 2004). O Espaço de Disse nos peixes é muito similar ao dos mamíferos – são espaços estreitos que separam as placas hepatocitárias dos sinusóides (Hinton & Couch, 1998).

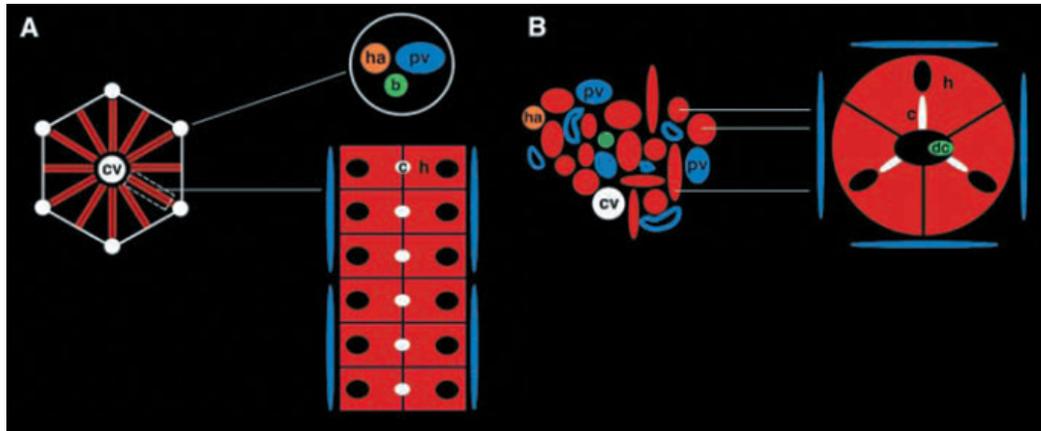


Figura 6 - Arquitetura hepática de mamíferos e teleósteos.

(A) Representação esquemática do lóbulo hepático de mamíferos, em formato hexagonal. O espaço porta (círculos brancos) está localizado nos vértices do lóbulo hepático e é cercado por placas bilaterais de hepatócitos (h). Cada espaço porta contém um ramo da veia porta (pv), um ramo da artéria hepática (ha) e um ducto biliar (b), envolto por uma bainha de tecido conjuntivo. O canalículo biliar está localizado entre os hepatócitos adjacentes. As placas hepatocitárias estão separadas por capilares sinusoidais revestidos por um endotélio fenestrado (em azul) que permite a captação e transporte de macromoléculas. Estas placas são separadas das células endoteliais por uma lâmina basal. (B) Representação esquemática do fígado dos teleósteos. Os ramos da veia porta (pv), da artéria hepática (ha) e os ductos biliares (dc) não estão agrupados num espaço porta, mas sim, estão distribuídos aleatoriamente. Apesar de estarem representadas por cores diferentes a veia porta e a veia hepática são indistinguíveis. Os hepatócitos nos teleósteos estão arranjados em túbulos, cercados por endotélio fenestrado, dentro dos quais se localizam pequenos ductos biliares.

Fonte: Adaptado de (Lorent *et al*, 2004).

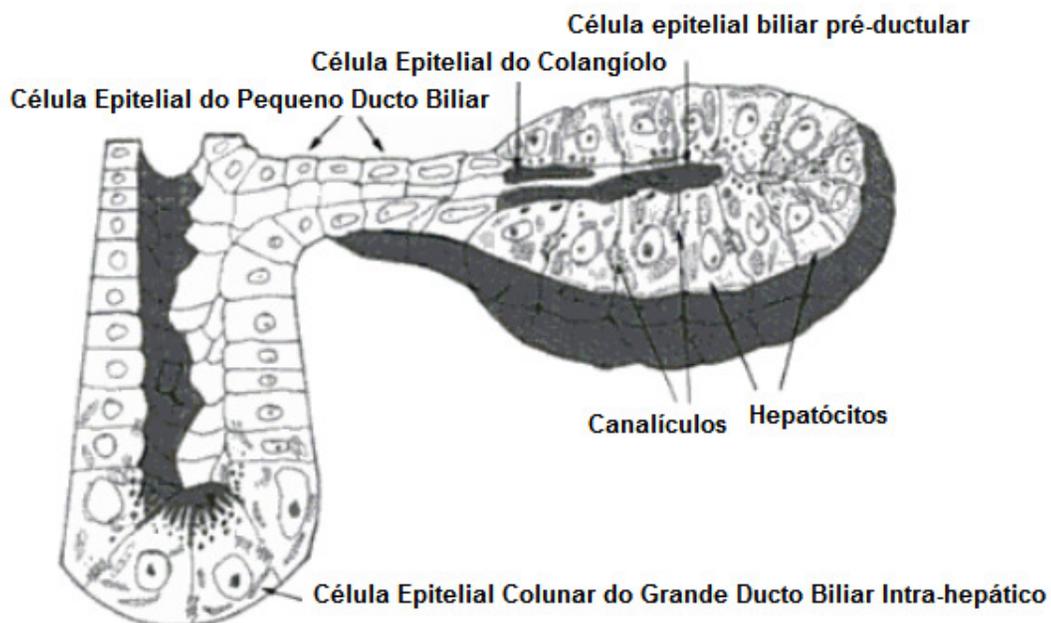


Figura 7 - Componentes do túbulo hepático e seu ducto exócrino em peixes.

Fonte: Adaptado de (Hinton & Couch, 1998).

O significado funcional desta arquitetura é que apenas a parte basal e basolateral dos hepatócitos estão diretamente expostas à perfusão sinusoidal (**Figura 8**). Em consequência, a adesão relativamente baixa de algumas substâncias químicas pelos hepatócitos dos peixes pode ser atribuída a esse detalhe arquitetônico. Por outro lado, o fluxo sanguíneo sutilmente mais lento nos sinusóides hepáticos dos peixes podem, em parte, compensar a reduzida área de exposição dos hepatócitos (Hinton & Couch, 1998; Wolf & Wolfe, 2005).

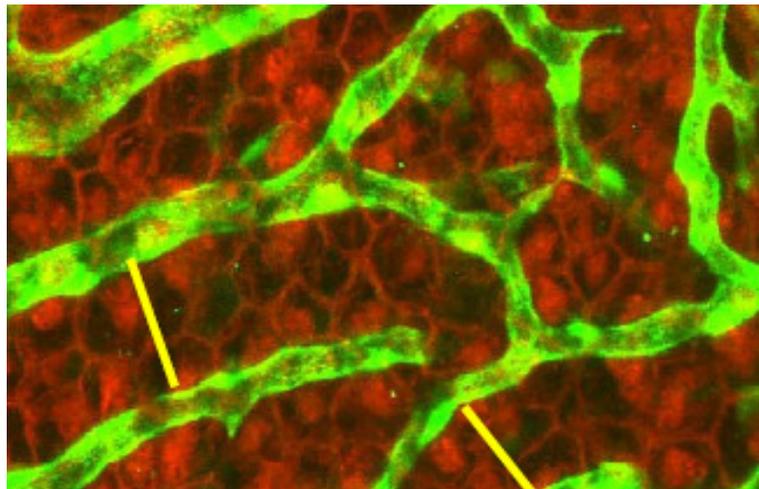


Figura 8 - Rede sinusoidal no fígado do Zebrafish.
Em verde a veia portal hepática em vermelho os cordões de hepatócitos e em amarelo uma linha mostrando 2 cordas de hepatócitos entre 2 sinusóides.
Fontes: Adaptado de (Korz *et al*, 2008).

Fisiologicamente, o fígado dos peixes também é responsável pelas mesmas funções metabólicas dos mamíferos, como processamento e armazenamento de nutrientes, síntese de enzimas e cofatores, formação de bile e metabolismo de composto xenobióticos. Como em humanos, os teleósteos também apresentam enzimas de biotransformação de fase 1 e 2 para a detoxificar os xenobióticos. Além disso, os peixes possuem muitos dos sistemas enzimáticos microsossomais e

citossólicos que os mamíferos, como as enzimas do complexo microsossomal citocromo P-450 e CYP1A. No entanto, os peixes têm relativamente menor capacidade do que os mamíferos de metabolizar os xenobióticos. Por outro lado, acredita-se que eles sejam capazes de excretar tais substâncias inalteradas pelas brânquias e isto implica em uma tendência à respostas menos severa à toxicidade de drogas que os mamíferos. Assim como os mamíferos, os peixes também possuem um mecanismo de circulação entero-hepática para a transformação de substâncias que não foram metabolizadas durante a primeira passagem pelo fígado (Wolf & Wolfe, 2005).

No entanto, no que tange à fisiologia, algumas diferenças também são observadas. Em humanos, a organização do parênquima hepático, conceituada como ácino hepático, apresenta-se como uma massa parenquimal irregular arranjada em torno de um pequeno trato portal o qual consiste de arteríola hepática, vênula portal, ductulo biliar, vasos linfáticos e nervos. A estrutura acinar é encontrada entre duas ou mais veias centrolobulares. Entre a tríade porta e a veia hepática central, existem três zonas que se diferenciam em sua composição enzimática, nutrição e oxigenação sanguínea (Wanless, 2007). Em geral, os nutrientes e oxigênio são mais concentrados na região periportal, a zona 1, e vão diminuindo conforme se aproximam da região perivenular, passando pela zona 2 e 3. Quanto as enzimas, aquelas envolvidas no ciclo do Ácido Cítrico, gliconeogênese, na síntese de uréia e colesterol, catabolismo de aminoácidos e secreção de ácido biliar são mais presentes na zona 1. Já as reações como a glicólise, lipogênese e as enzimas de detoxificação de drogas, como a citocromo P450 estão altamente expressas na zona 3 (Sherlock & Dooley, 2002). No Zebrafish, as enzimas de biotransformação são homoganeamente distribuídas por todo o fígado não tendo predileção por locais próximos a veias centrais, por exemplo. Por esse motivo, as

lesões em resposta à exposição tóxica tendem a ser aleatórias, sem padrão em zonas (Hinton & Couch, 1998).

Apesar disso, o Zebrafish tem sido eleito como bom modelo para estudos de toxicidade e triagem de drogas porque o mecanismo de defesa dos teleósteos contra os xenobióticos é equivalente ao dos mamíferos. Enzimas como hidroximetilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) sintase, HMG-CoA liase, os PPARs (Receptores Ativadores da Proliferação de Peroxissomos) e o citocromo P450 – importantes na metabolização hepática de drogas – estão presentes no Zebrafish (McGrath & Li, 2008).

Os hepatócitos do Zebrafish apresentam dimorfismo sexual no período de produção de vitelogenina. A vitelogenina é uma glicofosfolipoproteína sintetizada pelo fígado em resposta ao estrogênio liberado pelos ovários. Nas fêmeas em período vitelogênico, os hepatócitos apresentam maior quantidade de organelas envolvidas na síntese protéica, como o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi (Hinton & Couch, 1998).

Metabolismo dos Lipídeos no Zebrafish

Os lipídeos são a principal fonte energética dos peixes já que estes têm maior tendência a preservar o glicogênio hepático durante o jejum. Apesar disso, se desconhece, até o momento, a existência de mecanismo cetogênico em peixes (Wolf & Wolfe, 2005). O fígado dos peixes, como em humanos, é estimulado à lipólise por adrenalina, noradrenalina, glucagon e cortisol, entre outros; assim como o efeito inverso pela insulina também é observado (Sheridan, 1994).

Os lipídeos dietéticos geralmente perfazem de 8 a 15% da ingestão. O sistema de digestão e absorção destes parece ser o mesmo dos mamíferos: emulsificação por sais biliares produzidos pelo fígado e armazenados na vesícula biliar, hidrolisados por lipases e então absorvidos pelas células intestinais (Holtta-Vuori *et al*, 2010).

A absorção lipídica nos peixes parece acontecer em duas fases (Sheridan, 1988). O “componente rápido” ocorre imediatamente após a alimentação quando uma fração dos ácidos graxos da dieta são encontrados em solução diretamente no plasma (ácidos graxos de cadeia curta) ou ligados a proteínas transportadoras (ácidos graxos de cadeia longa). O “componente lento” corresponde à síntese e transporte dos triglicerídeos pelas quilomicras, como ocorre em mamíferos (Sheridan, 1988).

Nos teleósteos, assim como nos mamíferos, as gorduras são armazenadas na forma de triglicerídeos e os locais de armazenamento incluem músculos, tecido adiposo visceral e subcutâneo (Holtta-Vuori *et al*). O transporte destes triglicerídeos até os tecidos extra-hepáticos também se dá através lipoproteínas.

O Zebrafish apresenta maiores quantidades de lipídeos e colesterol circulantes quando comparado aos humanos. Apesar disso, as lipoproteínas e suas apoproteínas são, funcionalmente, comparáveis aos mamíferos e HDL (*High density lipoprotein*) parece ser a mais abundante. As partículas de LDL (*Low density lipoprotein*) em peixes apresentam maiores quantidades de triglicerídeos e menores de colesterol que o LDL de humanos (Holtta-Vuori *et al*, 2010).

O Zebrafish como modelo para estudos de doenças hepáticas

A facilidade de manipulação do Zebrafish é a principal responsável pelo aumento do seu uso como modelo animal na ciência. O desenvolvimento de modelos de doenças a partir da administração de tóxicos ou, até mesmo, de toxicidade de drogas é especialmente vantajoso já que estes podem ser administrados na água. Comparado com outros animais, um número maior de peixes podem ser utilizados para cada ensaio e, em contrapartida, menores quantidades de drogas são requeridas (McGrath & Li, 2008). Por tudo isso, a EPA (United States Environmental Protection Agency) elegeu o Zebrafish como o único animal para avaliação de contaminantes ambientais e como triagem inicial para o desenvolvimento de toxicidade (Collins *et al*, 2008; McGrath & Li, 2008)

O *Danio rerio* também já foi utilizado para o desenvolvimento de modelos de doenças hepáticas (**Tabela 1**). Em 2006, Amali & colaboradores (Amali *et al*, 2006) utilizaram tioacetamida (TAA) para criar um modelo de esteato-hepatite em embriões de Zebrafish. Para isso, embriões de 72 horas pós fertilização receberam 0,025% de TAA por 10 dias – período em que se observou acúmulo de lipídios nos hepatócitos. Mais tarde, em 2008, o mesmo grupo obteve esteatose, esteato-hepatite, cirrose e hepatocarcinoma a partir de injeções intraperitoneais de 300 mg/kg de TAA por um período de até 12 semanas em animais adultos (Rekha *et al*, 2008). Neste estudo, após duas semanas de experimento já foi possível observar alterações histológicas compatíveis com esteatose hepática.

Tabela 1 - Publicações utilizando Zebrafish como modelo animal para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao fígado.

Referência	Doença
(Sadler <i>et al</i> , 2005)	Cisto de colédoco tipo I e II, esteatose Hepática e Colestase por Artrogripose
(Lam <i>et al</i> , 2006)	Hepatocarcinoma por exposição à dimetilbenzeno-antraceno e dibenzopireno
(Amali <i>et al</i> , 2006)	Esteato-hepatite por tioacetamida
(Rekha <i>et al</i> , 2008)	Esteato-hepatite, cirrose e hepatocarcinoma por tioacetamida
(Passeri <i>et al</i> , 2009)	Doença hepática gordurosa alcoólica
(Matthews <i>et al</i> , 2009)	Esteatose hepática por redução da S-adenosilhomocisteína hidrolase
(Shieh <i>et al</i> , 2010)	Esteatose hepática pela expressão da proteína X do vírus da Hepatite B
(Gao <i>et al</i> , 2010)	Doença hepática cística
(Matthews <i>et al</i> , 2010)	Atresia Biliar

Tioacetamida

A tioacetamida (C_2H_5NS) é um cristal organosulfuroso transparente e hidrossolúvel, também conhecido como etanotioamida ou acetotioamida (IARC, 1974). Originalmente, a tioacetamida (TAA) era empregada como fungicida em lavouras de laranja, como acelerador na vulcanização da borracha ou como solvente orgânico na indústria têxtil, papelreira e de curtume (Report on Carcinogens, 2005). Em 1948, Garth Fitzhugh & Arthur Nelson publicaram o primeiro estudo descrevendo um possível poder hepatotóxico da TAA (Shetty *et al*, 1971). A partir de então a TAA foi amplamente utilizada como indutor de lesão hepática em modelos experimentais para doenças do fígado (Mangipudy *et al*, 1995).

Para que ocorra o dano hepático, a TAA necessita passar por diversas etapas de ativação metabólica. Esta bioativação ocorre através do complexo microsomal citocromo P-450, localizado no retículo endoplasmático liso hepático. Este sistema enzimático é formado por várias enzimas, dentre as quais, a CYP2E1 parece ser a mais implicada na bioativação da TAA (Baskaran *et al*, 2010).

A primeira etapa de metabolização da TAA compreende a sua conversão em tioacetamida sulfóxido (TASO) – um metabólito intermediário estável da TAA que é potencialmente necrogênico e carcinogênico. Estudos indicam que a TASO é a principal responsável pelos hepatotoxicidade da TAA. Esta hipótese se justifica após estudos nos quais foram observados os efeitos da TASO sobre a necrose e carcinogênese são similares, ou maiores, aos da TAA (Chilakapati *et al*, 2007a).

Na segunda etapa da biotransformação da TAA, a TASO é convertida à tioacetamida-S,S-dióxido (TASO₂) (Chilakapati *et al*, 2007a). A TASO₂ é um metabólito instável e altamente reativo que se liga covalentemente às macromoléculas hepáticas formando derivados da *acetylimidolysine*. Este composto é outro responsável pelo dano hepático induzido pela TAA uma vez que é capaz de provocar necrose e formação de espécies reativas de oxigênio (**Figura 9**). Além disso, a TAA também pode gerar acetamida. No entanto, a acetamida não costuma produzir lesões hepáticas como as relatadas por TAA, mesmo quando administrada em altas doses (Mangipudy *et al*, 1995; Chilakapati *et al*, 2007a).

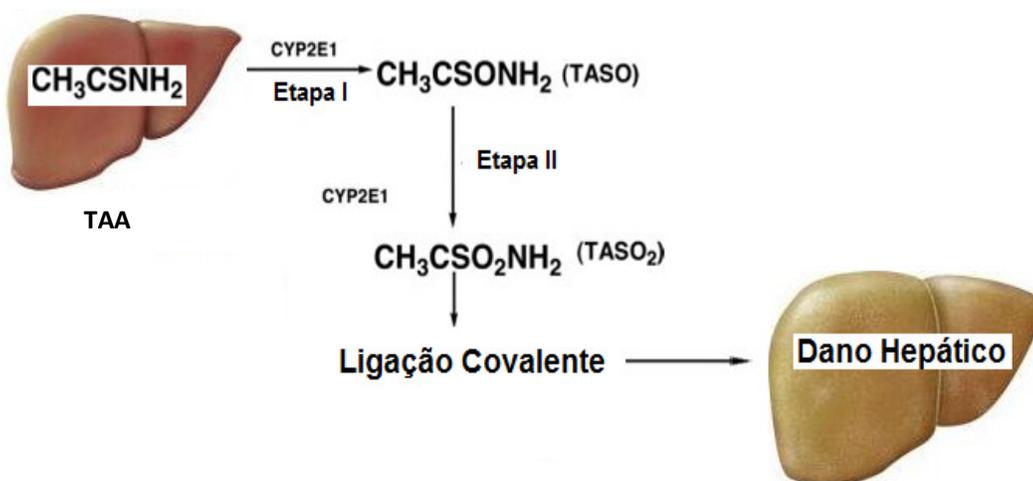


Figura 9 - Metabolismo de ativação da tioacetamida (TAA) no fígado através da enzima CYP2E1.

A TAA, no fígado, sofre ação da enzima CYP2E1 transformando-se em tioacetamida sulfóxido (TASO) – a primeira etapa da bioativação. Na segunda etapa, a TASO é convertida a tioacetamida-S,S-dióxido (TASO₂), novamente, pela CYP2E1. A TASO₂ é altamente reativa e se liga as macromoléculas hepáticas produzindo dano hepática.

Fonte: Adaptado de (Chilakapati *et al*, 2007b).

A TAA é capaz de reduzir a atividade antioxidante e promover a peroxidação lipídica no fígado, estabelecendo assim uma condição de estresse oxidativo propício ao dano hepático (Tunez *et al*, 2005). Além disso, a TAA parece alterar o metabolismo dos lipídeos, das lipoproteínas, do ciclo da uréia e o perfil sérico de aminoácidos (David *et al*, 2002).

O tipo de dano provocado por esta hepatotoxina depende da dose e do tempo de exposição à droga. A combinação deste binômio resulta no desenvolvimento de modelos de doenças como esteatose hepática, esteato-hepatite, cirrose, hepatocarcinoma e insuficiência hepática aguda (Mangipudy *et al*, 1995; Rekha *et al*, 2008).

Uma das vantagens do uso da TAA como toxina para modelos de doença hepática é a sua alta especificidade pelo fígado, exceto em doses excessivamente

altas, quando os rins também podem ser afetados (Chilakapati *et al*, 2005). Por esse motivo, a tioacetamida foi utilizada recentemente para indução de dano hepática em Zebrafish (Amali *et al*, 2006; Rekha *et al*, 2008).

Taurina

Considerações Gerais

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é um aminoácido sulfônico descoberto em 1827 como um dos componentes da bile de bovinos (Huxtable, 1992). Abundante em leucócitos (20-50 mM), a taurina também pode ser encontrada em tecidos animais (10-80 mM) como coração (30 mM), pulmão (11-17 mM), retina (70 mM) e fígado (10 mM), entre outros. Apesar das altas concentrações intracelulares, taurina também é encontrada no plasma, porém, em concentrações bem modestas (10-100 µM). No entanto, este aminoácido não é comumente encontrado em plantas com exceção de algumas algas (Schuller-Levis & Park, 2003; Bouckenooghe *et al*, 2006).

A taurina, embora não seja incorporada as proteínas, é considerada um aminoácido condicionalmente indispensável em humanos, já que pode ser sintetizado no fígado a partir da metionina e cisteína. Este processo envolve duas enzimas diferentes: a primeira, *cisteína dioxigenase*, oxida a cisteína-ácido sulfinico para então ser descarboxilada pela *cisteína-ácido sulfinico descarboxilase*. O produto desta reação, a hipotaurina, é finalmente oxidada formando a taurina. Estas

enzimas, expressas no fígado, também podem ser encontradas em tecidos como rins e cérebro, locais alternativos para a síntese de taurina (Bouckenooghe *et al*, 2006).

Em neonatos, os baixos níveis de *cisteína dioxigenase* e a imaturidade renal impedem a reabsorção tubular de taurina tornando este aminoácido essencial nessa faixa-etária. Por esse motivo, a taurina tem sido adicionada a fórmulas infantis e soluções parenterais comerciais que, diferentemente do leite materno, eram deficientes nesse aminoácido (Schuller-Levis & Park, 2003; Verner *et al*, 2007). Em determinadas situações de estresse metabólico como sepse, nutrição parenteral prolongada, traumas e cirurgias, as concentrações de taurina também podem encontrar-se diminuídas (Lamonica-Garcia *et al*, 2008).

Além da síntese, este aminoácido também pode ser adquirido através da dieta (principalmente em carnes de peixes marinhos (Schuller-Levis & Park, 2003)), no entanto não existem recomendações estabelecidas para ingestão diária (RDA - Recommended Daily Allowance) em humanos (Lamonica-Garcia *et al*, 2008). A média de ingestão diária de taurina em adultos é de 58 mg podendo variar de 17 mg a 1000 mg conforme o padrão dietético. Assim, níveis baixos são encontrados em vegetarianos estritos e altos níveis em consumidores de frutos do mar e energéticos à base de taurina (Franconi *et al*, 2006).

A excreção da taurina ocorre por via renal e também através dos sais biliares. Dessa forma, o excesso de taurina adquirida da dieta é eliminado na urina. Quando o aporte de taurina é limitado, os rins aumentam a reabsorção desse aminoácido diminuindo sua excreção (Sturman, 1988)

A taurina, comparada com outros aminoácidos carboxílicos apresenta difusão lenta através de membranas lipofílicas isto porque este aminoácido possui

baixa lipofilicidade e alta solubilidade em água (Huxtable, 1992). Além disso, sua captação também pode ser feita por um sistema transportador dependente de Na^+ e Cl^- na membrana celular. Este sistema envolve um transportador de taurina (TauT) com alta especificidade e afinidade. O sistema de captação de taurina via TauT ocorre por transporte ativo secundário e envolve 2Na^+ e 1Cl^- (Oja *et al*, 2006; Kozłowski *et al*, 2008).

Várias pesquisas demonstraram que a taurina exerce diversas funções no organismo e muitas delas com vital importância, como osmoregulação, conjugação com sais biliares, detoxificação e ação antioxidante (Bouckenooghe *et al*, 2006; Schaffer *et al*, 2010).

Como um osmólito orgânico, a taurina é utilizada por diversas espécies para a adaptação ao desequilíbrio osmótico (Schaffer *et al*, 2000). Nos peixes e invertebrados marinhos, os osmólitos orgânicos contribuem com 60-70% da osmolaridade celular total. Nestes animais, a taurina serve como principal agente osmorregulador, isto é, as variações no teor de taurina de um tecido são suficientes para promover o ajuste osmótico deste tecido. A importância desta função, no entanto, varia conforme a espécie. Em mamíferos, as variações na concentração de taurina respondem, em geral, por uma reduzida parcela do controle osmótico. Por esse motivo, a taurina *per se* é insuficiente no controle da osmorregulação celular em mamíferos. No entanto, a taurina também pode atuar no controle osmorregulatório através da alteração do movimento de outras substâncias osmoticamente ativas, como íons ou água (Huxtable, 1992; Schaffer *et al*, 2000).

A taurina também está envolvida na modulação da homeostase do cálcio, essencial para contração do músculo esquelético e cardíaco. Foi observado que animais com cardiomiopatia por deficiência de taurina tiveram reversão do quadro

com suplementação deste aminoácido e que, os efeitos advindos da deficiência tinham reflexos tanto na função sistólica quanto diastólica. Embora não se conheça o mecanismo subjacente desta cardiomiopatia, é aceito atualmente que esta insuficiência cardíaca seja caracterizada pela contração prejudicada em decorrência da diminuição da sensibilidade ao Ca^{+2} das proteínas contrácteis, perda de cardiomiócitos e/ou insuficiência do ATP em direcionar a contração. Neste sentido, concentrações fisiológicas de taurina parecem aumentar a sensibilidade de Ca^{+2} das proteínas de contração. Além disso, a taurina é capaz de aumentar a capacidade de armazenamento de Ca^{+2} no retículo sarcoplasmático e reduzir a difusão passiva de Ca^{+2} pelas membranas – o que justifica sua importância no processo de contração muscular (Schaffer *et al*, 2010).

Aproximadamente um terço dos sais biliares secretados são conjugados com taurina. A conjugação dos sais biliares promove uma resistência a precipitação em pH fisiológico. Sais biliares livres precipitam em pH menor que 7 enquanto que a conjugação com taurina oferece resistência a precipitação até valores muito baixos de pH (Donovan & Konikoff, 2007). Em todos os vertebrados, exceto os mamíferos, a taurina é o único aminoácido conjugado com derivados do colesterol para formar sais biliares. Mamíferos utilizam glicina, além de taurina, para a conjugação (Huxtable, 1992). Apesar disso, fetos e recém nascidos de humanos amamentados com leite materno (até a terceira semana de vida) apresentam conjugação de sais biliares predominantemente com taurina (Brueton *et al*, 1978). Além de sais biliares, a taurina também é capaz de se conjugar com diversos xenobióticos. A conjugação dos xenobióticos proporciona o aumento da polaridade e solubilidade em água - facilitando assim a sua excreção. O grau de utilização de taurina para esse fim varia de acordo com a espécie, podendo ser zero ou até 30%.

Assim, em alguns peixes, 90% da dose de ácido fenilacético é conjugado com taurina enquanto que em ratos apenas 1% deste composto sofre conjugação (Huxtable, 1992).

Embora a conjugação com ácidos biliares seja o efeito mais conhecido da taurina, o seu potencial antioxidante tem sido largamente estudado nos últimos anos. A ação da taurina como antioxidante parece estar relacionada à sua atividade *scavenger* (substância capaz de atenuar os efeitos tóxicos de uma molécula) (Balkan *et al*, 2001). Mesmo em concentrações fisiológicas, a taurina tem habilidade de proteger a célula contra o estresse oxidativo por reduzir o dano peroxidativo aos lipídeos e prevenir a oxidação dos grupos tióis (Oliveira *et al*). A taurina, também, é capaz de neutralizar o hipoclorito advindo da reação da mieloperoxidase dos neutrófilos com íon Cloro. Este hipoclorito reage com aminas primárias formando a Cloramina – molécula potencialmente oxidante causadora de danos ao DNA. A taurina reage com a cloramina produzindo um composto menos tóxico e mais estável: a Taurina-Cloramina. A Taurina-Cloramina parece ser um poderoso regulador do sistema imune, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (Schuller-Levis & Park, 2004).

Alguns autores reportaram um efeito protetor da taurina sobre integridade hepática contra danos causados por agentes hepatotóxicos (Chen *et al*, 2006; Tasci *et al*, 2008). Chen e colaboradores (Chen *et al*, 2006), avaliando o efeito da taurina em ratos induzidos a esteato-hepatite por dieta hiperlipídica, observaram uma significativa redução na massa hepática, nos padrões de estresse oxidativo, na expressão de TNF- α além da melhora histológica comparada ao grupo com esteatose. Ratos previamente tratados com taurina, submetidos à lesão intestinal após isquemia-reperfusão por oclusão da artéria mesentérica superior,

apresentaram redução na expressão de TNF- α no soro e caspase-3 no fígado além de uma melhora no padrão histológico quando comparado ao controle com lesão - evidenciando o efeito antiapoptótico e anti-inflamatório da taurina (Zhang *et al*, 2008). Ainda sobre o efeito antiapoptótico, foi visto que o tratamento com taurina em modelo murino para lúpus eritematoso sistêmico, tratado com dieta hipercolesterolêmica, reduzia a atividade apoptótica no fígado destes animais (medida através da atividade na caspase-3 no tecido hepático) (Hsu *et al*, 2008). A taurina apresenta ainda atividade antioxidante (Erman *et al*, 2004; Balkan *et al*, 2005). Ratos induzidos ao dano hepático por álcool e tratados com taurina apresentaram menor peroxidação lipídica que os controles sem taurina (Kerai *et al*, 1998). Em modelo de esteatose induzida por dieta rica em colesterol/lipídeo em *hamsters*, a taurina mostrou papel protetor no desenvolvimento da esteatose hepática o que foi acompanhado da redução da peroxidação lipídica e do aumento das enzimas antioxidantes (Chang *et al*, 2011).

JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, a doença hepática alcoólica e a hepatite viral foram as principais causas de morbi-mortalidade por doença hepática em diversos países. Com o dramático aumento da obesidade, a DHGNA se tornou a hepatopatia mais comum no Ocidente e uma causa importante de morbi-mortalidade relacionada às doenças do fígado. Não se dispõem, atualmente, de tratamentos satisfatórios para o manejo da DHGNA e, por isso, faz-se necessária a busca de alternativas terapêuticas – como os antioxidantes.

Há algum tempo a taurina tem sido estudada como um possível agente hepatoprotetor. Dessa maneira, este estudo pretende avaliar o efeito da taurina em modelo experimental de esteatose hepática induzida por tioacetamida em Zebrafish. A escolha desse modelo animal se deve a facilidade de realização dos experimentos, uma vez que esse método já é utilizado em nosso laboratório, e é sabidamente de fácil manejo com semelhança bioquímica, anatômica, genética e molecular a mamíferos. Até o presente momento, não foram identificados estudos que avaliem o uso da taurina em dano hepático induzido por tioacetamida em Zebrafish.

HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a taurina administrada nos animais expostos a tioacetamida reduza a intensidade da esteatose hepática em relação aos peixes não tratados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzida por tioacetamida em Zebrafish (*Danio rerio*).

Objetivos Específicos

- Reproduzir o modelo de esteatose hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*, adulto, *wild-type*;
- Avaliar o efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzido por tioacetamida utilizando métodos histoquímicos e histológicos (Hematoxilina e Eosina; *Oil Red.*);
- Mensurar a lipoperoxidação no fígado dos animais controle e expostos tanto à taurina quanto à tioacetamida;
- Determinar a atividade das enzimas de defesa antioxidante Superóxido dismutase e Catalase no tecido hepático;
- Avaliar o efeito da taurina e tioacetamida sobre os triglicerídeos séricos dos animais;

- Quantificar a expressão hepática dos genes, receptor 2 de adiponectina, Sirtuína 1 e TNF- α .

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

Os animais foram alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Animais

Foram utilizados para o projeto 288 peixes *Danio rerio*, adultos, adquiridos em loja de aquarismo. Os peixes foram mantidos em aquários (no máximo 5 peixes para cada 1 litro de água), a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de 10 horas de escuro e 14 horas de luz e constante aeração (**Figura 10**). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial própria para peixes (Westerfield, 2000).

Quadro 1: Distribuição dos animais por grupo experimental

	Análise Histológica e Histoquímica	Estresse Oxidativo	Expressão gênica	Dosagem de Triglicerídeos	Total (mais % de mortalidade)
Controle Salina	6	20	8	12	72
Controle Taurina	6	20	8	12	72
Expostos	6	20	8	12	72
Tratados	6	20	8	12	72
TOTAL	24	80	32	48	288



Figura 10 - Aquários utilizados para os experimentos alocados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Desenho experimental

Indução a esteatose

Para a indução de esteatose foi utilizada injeção intraperitoneal de tioacetamida (TAA). Em duas semanas de tratamento com TAA foi observado acúmulo de lipídeos nos hepatócitos (Rekha *et al*, 2008). TAA (300 mg/kg) foi diluída em solução salina perfazendo um total de 20 μ L de solução final e administrada três vezes na semana.

Tratamento com taurina

A taurina foi adicionada à solução que continha tioacetamida, na dose de 1000 mg/kg (Tasci *et al*, 2008). No grupo que teve apenas tratamento com taurina (TAU), esta foi diluída em solução salina perfazendo um total de 20 μ L de solução final. Todos os grupos tiveram injeções intraperitoneais três vezes por semana durante 14 dias.

Preparo das soluções e injeção

O cálculo dos solutos foi baseado na média dos pesos dos animais. Para a pesagem, os animais foram retirados e colocados em um recipiente com água individualmente (**Figura 11**). Este recipiente foi previamente pesado e seu peso zerado na balança (Marte, Modelo AS5500C).

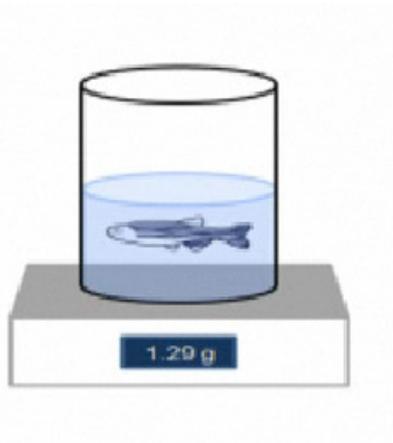


Figura 11 - Método de pesagem dos peixes.

Fonte: Adaptado de (Kinkel *et al*, 2010).

Os solutos foram pesados em um microtubo colocado no interior de uma balança analítica (Kern[®] 410). Os microtubos foram guardados em temperatura ambiente, ao abrigo de luz e umidade, até o dia da injeção.

Nos dias em que os animais foram injetados os solutos eram dissolvidos em soro fisiológico (20 μ L solução para cada animal). A solução foi homogeneizada com o auxílio de pipeta e posteriormente levado ao vórtex (Phoenix[®] AP56) por 15 segundos.

Para a injeção, os animais foram retirados, um a um, com rede pequena para contenção e imediatamente injetados. A administração foi feita no ponto médio entre as nadadeiras pélvicas. A agulha deve apontar cranialmente e ser inserida

mais próxima da cintura pélvica do que do ânus (**Figura 12**) (Kinkel *et al*, 2010). Este procedimento não ultrapassava 30 segundos. Após a injeção os peixes eram transferidos para outro aquário e lá permaneciam até que todos os animais do seu grupo fossem injetados. Foram utilizadas seringas para insulina (BD Ultra-fine II – 50 unidades, agulha com 0,3 mm de calibre) para as injeções intraperitoneais.



Figura 12 - Injeção intraperitoneal do Danio rerio adulto.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos (**Tabela 2**) e mantidos 14 dias. Após cada experimento, os animais foram crioanestesiados e o fígado retirado para posteriores análises histológicas, histoquímicas, de expressão gênica e de estresse oxidativo.

Tabela 2: Grupos experimentais.

Grupo	Descrição
Controle (Ctrl)	Animais sem tratamento com taurina e sem exposição à tioacetamida com injeção intraperitoneal de solução salina;
Taurina (TAU)	Animais com tratamento de taurina (1000 mg/kg) e sem exposição à tioacetamida,
Tioacetamida (TAA)	Animais sem tratamento com taurina e com exposição à tioacetamida (300 mg/kg).
Taurina+Tioacetamida (TAU+TAA)	Animais com tratamento de taurina (1000 mg/kg) e com exposição à tioacetamida (300 mg/kg).

Para a crioanestesia, os animais foram colocados em um recipiente com água a zero graus Celsius e lá permaneceram por 30 segundos. Após este período os animais foram transferidos para recipiente forrado com papel filtro. Para facilitar o manuseio, o peixe foi afixado com uma agulha pela sua nadadeira caudal e outra no olho (**Figura 13**). O sangue dos animais foi retirado da veia caudal após excisão da cauda e aspirado com pipeta (10 μ L) utilizando ponteiros de baixa retenção de líquido (**Figura 14**).

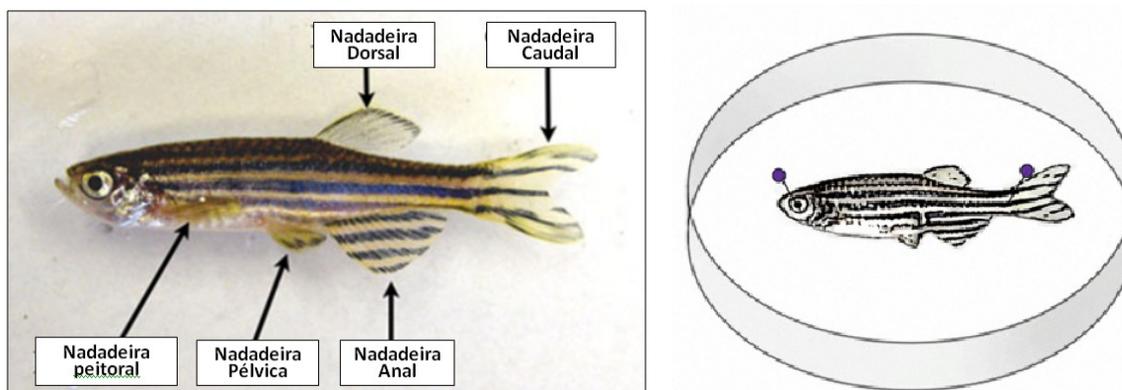


Figura 13 - Esquema de afixação dos animais para a retirada do fígado.
 Fonte: Adaptado de (Kinkel *et al*, 2010).



Figura 14 - Procedimento de retirada do sangue dos animais.

O procedimento de retirada do fígado ocorria em 3 etapas:

- Etapa 1: incisão com microtesoura a partir do ventre do peixe, imediatamente anterior ao ânus. O corte seguia ao longo do abdomen em direção ao opérculo - o revestimento rígido sobre as guelras próximo a nadadeira peitoral (**Figura 15**, etapa 1).

- Etapa II: do opérculo o corte subia até a parte posterior da cabeça, seguia subjacente a coluna (em direção a nadadeira dorsal) e então descia até a nadadeira anal.

-Etapa III: O fragmente era retirado com auxilio de pinça de microcirurgia no sentido cabeça-cauda (**Figura 15** - etapa 2 e 3).

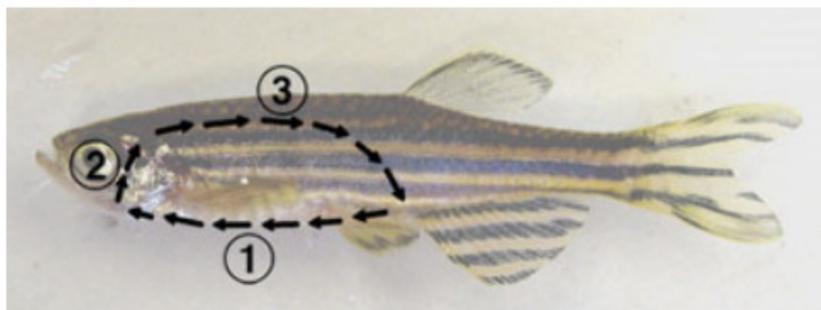


Figura 15 - Etapas para retirada do tecido hepático.
 Fonte: Adaptado de (Kinkel *et al*, 2010).

Após a retirada dos fígados, as carcaças dos animais foram congeladas e destinadas ao descarte biológico.

Análise Histológica e Histoquímica

Para a realização da técnica de Hematoxilina e Eosina, as amostras de fígado foram armazenadas em formalina (10 % tamponada). Para a técnica de *Oil Red* as amostras de fígado foram congeladas a -20º Celsius (Kinkel *et al*, 2004). Após o processamento histológico padrão, as imagens foram capturadas em microscópio (Olympus BX51) com aumento de 1000 vezes. As imagens capturadas foram quantificadas com o auxílio do programa Adobe® Photoshop® CS3.

Para a quantificação, a cor que representava positividade de gordura pela técnica de Oil Red O foi selecionada como primeiro plano e a cor que representava o tecido hepático, como segundo plano. O valor em *pixels* relativo ao primeiro plano e ao valor do somatório do primeiro e segundo planos a foram anotados e transformados em percentual (Vercelino *et al*, 2010).

A avaliação histológica e as fotografias foram feitas um patologista cegado quanto aos grupos.

Avaliação do estresse oxidativo

Preparação do homogeneizado

Para a realização das técnicas de estresse oxidativo as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C . Foram utilizados 9 ml de solução tampão fosfato por grama de tecido. O *pool* de fígados foi homogeneizado durante um minuto à temperatura de 4 graus Celsius. Em média, foram necessários 5 fígados ou 50 mg para a execução total das técnicas para avaliar estresse oxidativo. Este homogeneizado foi então centrifugado por 10 minutos a $1110 \times g$ em centrífuga refrigerada. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado e congelado no freezer a -80 graus Celsius para posterior utilização nas dosagens.

Dosagem de proteína

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (Sigma). As amostras foram mensuradas por espectrofotômetro em 595nm e os valores expressos em mg/mL. Estes foram utilizados para o cálculo dos valores de TBARS (Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e da atividade das enzimas antioxidantes.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento da coloração ocorre devido à presença de malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram colocadas em microtubos, nesta ordem de adição, 0,30mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,10mL do homogeneizado, 0,20mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 0,10mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Os microtubos foram agitados e aquecidos a 100 graus Celsius. Os microtubos foram então resfriados e acrescentado 0,60mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Estes foram agitados por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 2150 x *g*. O produto corado, presente na fração superior, foi lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína (Buege & Aust, 1978).

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Esta enzima catalisa a reação de dois ânios superóxidos com a conseqüente formação de peróxido de hidrogênio. Este produto é altamente reativo e pode ser degradado por duas enzimas: Catalase e Glutathione Peroxidase. Para

sua detecção, utiliza-se adrenalina que, em meio alcalino, transforma-se em adenocromo.

Antes de realizar a determinação, faz-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 11) com 50 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta corresponde a 100% da reação. Essa mistura foi agitada e lida a 480 nm. Posteriormente, adicionam-se diferentes volumes do homogeneizado e mede-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades SOD/mg de proteína (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina) (Misra & Fridovich, 1972).

Atividade da catalase (CAT)

Esta enzima decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção a 240 nm.

A medida espectrofotométrica consistiu em colocar na placa o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra. Depois, foi feito um gráfico com uma linha de base. Em seguida, se adicionou 20 μ L de H₂O₂ a 300 mM. A atividade foi expressa em pmol de CAT por grama de proteína (Boveris & Chance, 1973).

Dosagem sérica de Triglicerídeos

Para o a dosagem dos triglicerídeos foi necessário pool de sangue de 4 animais. O sangue retirado foi centrifugado por 10 minutos a 1612 x *g*. Após a centrifugação foi retirado aproximadamente 5 µL de soro. O soro foi armazenado geladeira e analisado após 24 horas.

O teste de triglicerídeos considera as reações da lipase lipoptoteica que hidrolisa os triglicerídeos liberando glicerol e ácidos graxos. O glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol cinase. Em presença de glicerol fosfato oxidase e oxigênio, o glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio. Ocorre também o acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4 clotofenol, pela peroxidase, produzindo quinoneimina, que é medida com absorbância 505nm.

Para realizar as dosagens de triglicerídeos, foram necessários três tipos diferentes de amostras. A amostra branco, que continha apenas reagente 1 (tampão 50 mmol/L, pH7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4aminoantipirina 300 µmol/l; ATP 1,8mmol/L; lipoproteína lipase ≥1400 U/L; glicerolcinase ≥1000 U/L; glicerolfosfatooxidase ≥ 1500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L e azida sódica 0,095%). A amostra padrão continha reagente 1 e reagente padrão (triglicerídeos 200mg/dL e azida sódica 0,045%) e as amostras teste continham reagente 1 e as amostras a serem analisadas. As quantidades sugeridas pelo fabricante é, na amostra Branco, 1 mL de reagente 1, na amostra padrão são 1mL de reagente 1 e 10µl de reagente padrão e nas amostras teste são 1ml de reagente 1 e 10µl de amostra.

Análise Molecular

Extração do RNA total

As amostras de fígado foram imediatamente imersas em 1000 μ l uma solução monofásica contendo fenol e tiocinato de guanidina (Trizol[®], Invitrogen). Em laboratório, esse tecido foi macerado com pistilo de inox banhado por Teflon[®] dentro do próprio microtubo até que o seu conteúdo ficasse turvo. Em seguida foram adicionados 200 μ l de clorofórmio (Labsynth[®]) nas amostras que eram homogeneizadas por 30 segundos em vórtex até que se obtivesse uma solução rosácea de aspecto leitoso. As amostras foram centrifugadas a 18,290 x *g* por 15 minutos a 6°C (Microcentrifuga Eppendorf modelo 5408R) para que ocorresse a separação das fases. Após a centrifugação eram visíveis 3 fases: a primeira, aquosa, que continha o RNA; a interfase branca e leitosa com DNA majoritariamente e a fase inferior rósea que continha predominantemente proteínas. A fase superior (fase aquosa) era então cuidadosamente aspirada (cerca de 400 μ l) e transferida para um novo microtubo.

Em novo microtubo, foram adicionadas às amostras 500 μ l de isopropanol (Labsynth[®]) que foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e encubadas por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 18,290 x *g* por 10 minutos a 6°C. O conteúdo líquido foi vertido e descartado de uma só vez. Os microtubos foram colocados sobre papel toalha para secagem por 10 minutos. Após a secagem foi acrescentado 1000 μ l de etanol 75% (Invitrogen[®]), o conteúdo foi homogeneizado (60 segundos em vórtex) e centrifugado a 21340 x *g* por 5 minutos a 6°C. Após a

centrifugação o conteúdo líquido foi vertido e o microtubo posto para secar sobre o papel toalha por 2 ou 3 horas. O pellet de RNA total foi ressuspensão em 20 μ l de água (água ultrapura estéril).

A quantificação do RNA foi feita utilizando 1 μ L de RNA em espectrofotômetro (NANODROP 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), lido em 260 nm e o resultado expresso em ng/ml. A pureza do RNA foi avaliada através da razão das leituras no comprimento de 260 nm e 280 nm. Todas as amostras apresentaram uma razão 260nm/280nm maior que 1,8.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Foram pipetados em um microtubo limpo de 200 μ l : 1 μ l de primer Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 μ g/ml, Invitrogen[®]), 1 μ l de deoxinucleotídeos (dNTP), 800ng de RNA total e água ultrapura estéril até completar 12 μ l. Os microtubos foram então colocados no termociclador (Veriti[®] Thermal Cycler, Applied Biosystems[®]) a 65°C por 5 minutos. Após este período os microtubos foram imediatamente colocados em gelo.

Foram pipetados cada microtubo: 4 μ l de tampão 5 vezes (Invitrogen[®]), 2 μ l de DTT 0,1 M (Invitrogen[®]) e 1 μ l de RNase OUT (40 unidades/ μ L. Invitrogen[®]). As amostras foram encubadas a 42°C por 2 minutos. Foi pipetado: 200U de SuperScript[™] RT (Invitrogen[®]) e as amostras levadas novamente ao termociclador por 50 minutos a 42°C para o alongamento do cDNA e a 70°C por 15 minutos desnaturação da enzima. O cDNA resultante foi estocado a -20°C.

A quantificação do cDNA foi feita utilizando 1 µL de amostra em espectrofotômetro (NANODROP 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), lido em 260 nm e o resultado expresso em ng/ml. A pureza do cDNA foi avaliada através da razão das leituras no comprimento de 260 nm e 280 nm. Todas as amostras apresentaram uma razão 260nm/280nm maior que 1,8.

Quantificação da expressão gênica.

Para a análise da expressão de mRNA dos genes TNF- α , SIRT1 e receptor 2 de adiponectina foi utilizado o método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). A quantificação do produto da PCR em cada ciclo se deu pela detecção de fluorescência existente em cada amostra de produto. Foi utilizado o sistema Taqman[®] constituído por um par de primers e uma sonda marcada com fluoróforo FAM.

Foram utilizados *primers* para TNF- α , SIRT1, receptor 2 de adiponectina e elongation factor 1 α (EF1 α), como padrão interno. As condições de ciclagem para a amplificação foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Foi utilizado termociclador Stratagene MX3000P[®].

A reação foi feita com um volume final de 20 µl, os quais foram compostos de: 1µl de Taqman[®] Gene Expression Assay 20 vezes, 10µl Taqman[®] Gene Expression Master Mix 2 vezes, 4 µl cDNA (100 ng) e 5 µl de água ultrapura estéril.

A quantificação da expressão gênica foi feita utilizando método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (threshold cycle). Para cada amostra, analisada em duplicata, o valor de ΔC_T foi obtido subtraindo o valor de C_T do EF1 α do valor de C_T do gene de interesse (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão relativa de mRNA entre os grupos foi calculada utilizando a expressão do grupo controle para a calibração.

Análise Estatística

Para variáveis quantitativas, os dados foram descritos como média e erro padrão ou como mediana e valor mínimo e máximo.

Inicialmente as amostras foram testadas quanto à normalidade da distribuição utilizando teste de Shapiro-Wilk. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA seguida de teste de Tukey quando as variáveis eram simétricas, e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, quando assimétricas. O nível de significância considerado foi de 5%.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 13.0, GraphPad Prism 5 e Excel (Windows) versão 2007.

Tamanho da amostra

O tamanho amostral para as análises de estresse oxidativo foi baseado nos estudos de Rosemberg & colaboradores (Rosemberg *et al*, 2010). Neste trabalho, os

pesquisadores avaliaram o efeito da taurina sobre o estresse oxidativo em cérebros de Zebrafish adultos utilizando $n=3$ *pools*. O tamanho amostral para as análises de expressão gênica foi pautado no estudo de Liu & colaboradores que utilizaram $n=6$.

Como a quantidade de material biológico fornecido por animal é muito pequena, foi necessário utilizar *pool* de 5 animais para as técnicas que avaliam o estresse oxidativo e 4 animais para a dosagem de triglicerídeos séricos. Para as análises histológicas, histoquímicas e de expressão gênica não foi necessária a utilização de *pool*. Dessa forma, para a realização de todos os experimentos seriam necessários 46 animais por grupo.

Considerando uma mortalidade de 30% durante o experimento, foram acrescentados mais 14 animais em cada grupo, perfazendo um total de 60 animais por grupo, isto é, 240 animais ao todo para o experimento.

No entanto, antes da realização do experimento, os animais necessitam de um período de aclimação de 14 dias. Durante esse período existe um percentual de mortalidade que varia conforme o grau de estresse que os animais sofrem para se adaptar ao novo aquário, podendo ser mínimo, em torno de 10%, ou chegando até por volta de 50%. Portanto, consideramos uma mortalidade de 20% para o período de aclimação dos animais.

Dessa forma, foram utilizados 288 animais para a execução deste estudo.

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) que estabelece

procedimentos para o uso científico de animais e a resolução Normativa 04/97 do HCPA que estabelece normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa.

Este estudo foi encaminhado ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA sob o número 09-393.

RESULTADOS

O uso de tioacetamida se mostrou efetivo em induzir esteatose hepática em Zebrafish (**Figura 16 e 17**). A quantificação das imagens resultou em uma diferença significativa entre os grupos ($n = 3$; $p < 0,0001$). O grupo TAA apresentou deposição lipídica significativamente maior que os grupos controle ($p < 0,001$), TAU ($p < 0,001$) e TAU+TAA ($p < 0,001$). No entanto, o teor de lipídeos séricos ($n = 3$) não apresentou diferença estatística entre os grupos (**Figura 18**).

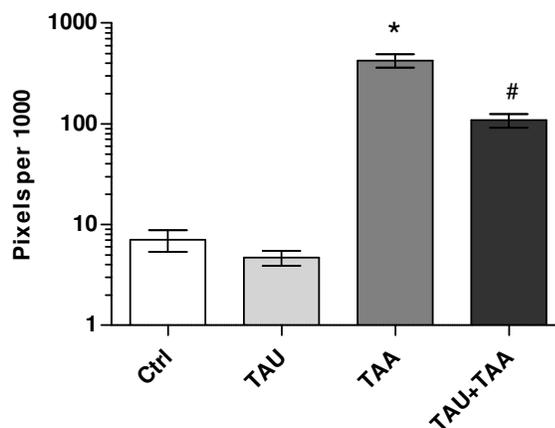


Figura 16 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre acúmulo hepático de lipídeos.

O acúmulo de gordura nos hepatócitos foi medido através do percentual de pixels da cor que representa positividade de gordura na técnica de Oil Red. Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e erro padrão. * Diferença entre o grupo controle (Ctrl) e tioacetamida (TAA). # Diferença entre os grupos TAA e cotratamento de taurina e tioacetamida (TAU+TAA).

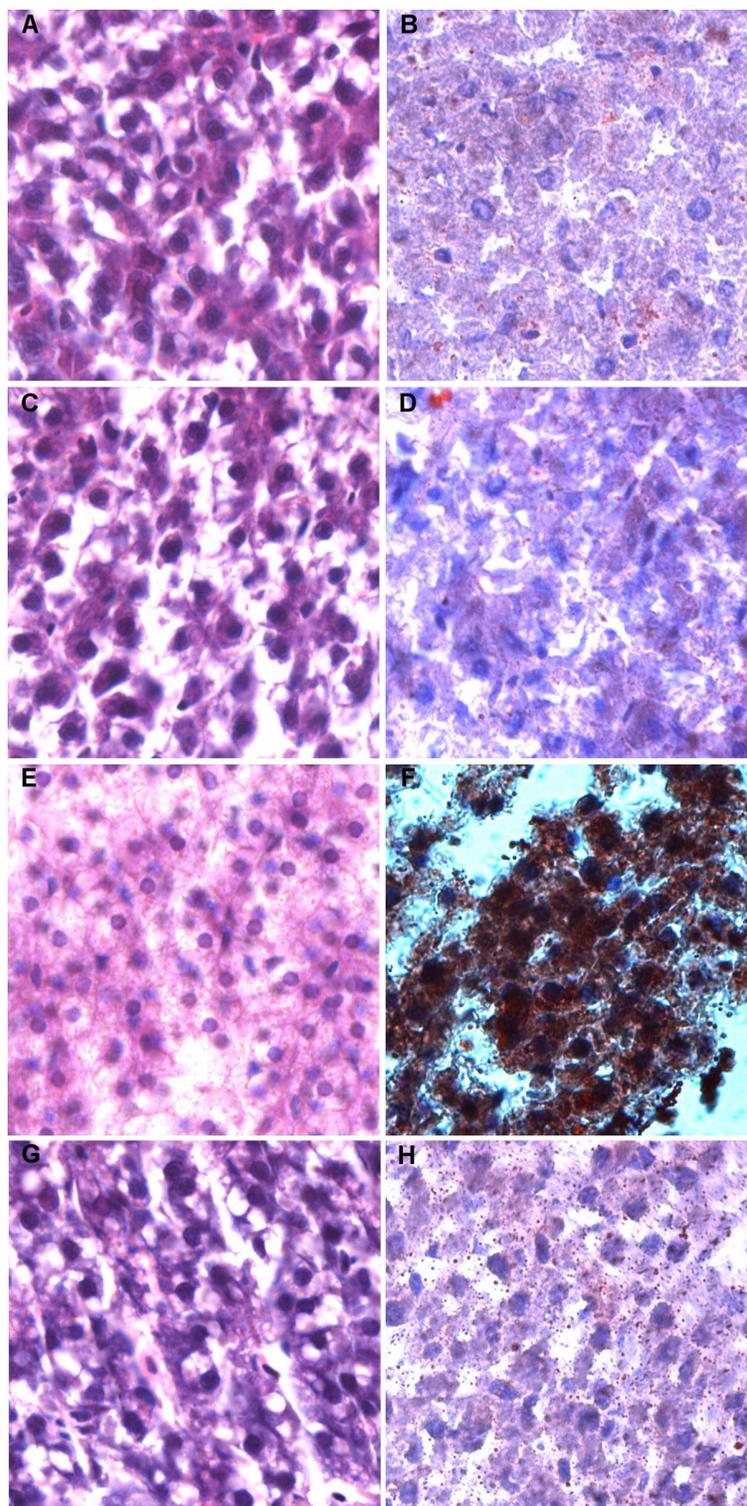


Figura 17 – Aspecto microscópico dos cortes de fígado dos quatro grupos (1000 ×).
A primeira coluna (A,C,E,G) apresenta coloração com hematoxilina e eosina e a segunda coluna (B,D,F,H) com Oil Red O. (A,B) Grupo controle. (C,D) Grupo taurina. (E,F) Grupo tioacetamida. (G,H) Grupo taurina-tioacetamida.

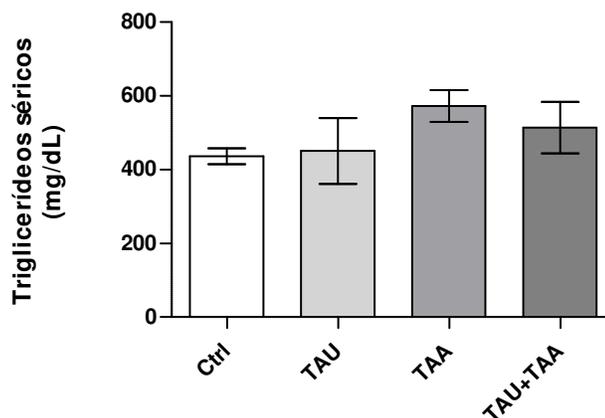


Figura 18 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre os triglicerídeos séricos.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e erro padrão.

A lipoperoxidação hepática, medida através da técnica de TBARS, mostrou ser diferente ($p < 0,0001$) entre os grupos (**Figura 19**). O grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa nas dosagens de lipídeos peroxidados quando comparado ao grupo TAA ($n = 5$; $p < 0,001$). Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos. O grupo TAU apresentou diferença estatística apenas quando confrontado com o grupo TAA, que teve um aumento na lipoperoxidação ($p < 0,001$). Os grupos controle e TAU+TAA não diferiram significativamente do grupo taurina. O grupo TAU+TAA apresentou menor dano lipídico quando comparado ao grupo TAA ($p < 0,001$).

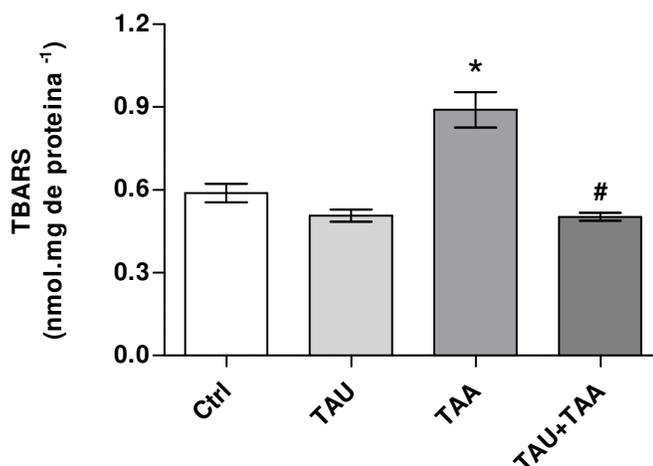


Figura 19 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a lipoperoxidação hepática avaliada através de TBARS.

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e erro padrão. * Diferença significativa entre o grupo controle (Ctrl) e tioacetamida (TAA). # Diferença entre os grupos TAA e cotratamento de taurina e tioacetamida (TAU+TAA).

As defesas antioxidantes hepáticas, representadas pela atividade das enzimas SOD e CAT, também foram avaliadas (**Figura 20**). A atividade da SOD (**Figura 20A**) apresentou diferença significativa entre os grupos ($p=0,0001$). O grupo TAA teve uma redução significativa na atividade da SOD quando comparado ao controle ($n = 5$; $p < 0,001$). No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e os demais grupos. O grupo taurina também apresentou diferença significativa na atividade da SOD em comparação ao grupo TAA, que estava com atividade enzimática menor ($p < 0,01$). Os grupos controle e TAU+TAA não diferiram significativamente do grupo taurina quanto à atividade da SOD. Os grupos TAA e TAU+TAA apresentaram diferença estatística quando comparados entre si, porém o grupo TAU+TAA teve maior atividade da SOD ($p < 0,05$). A atividade da enzimática da CAT (**Figura 20B**) não apresentou diferença entre os grupos ($n = 4$; $p=0,543$).

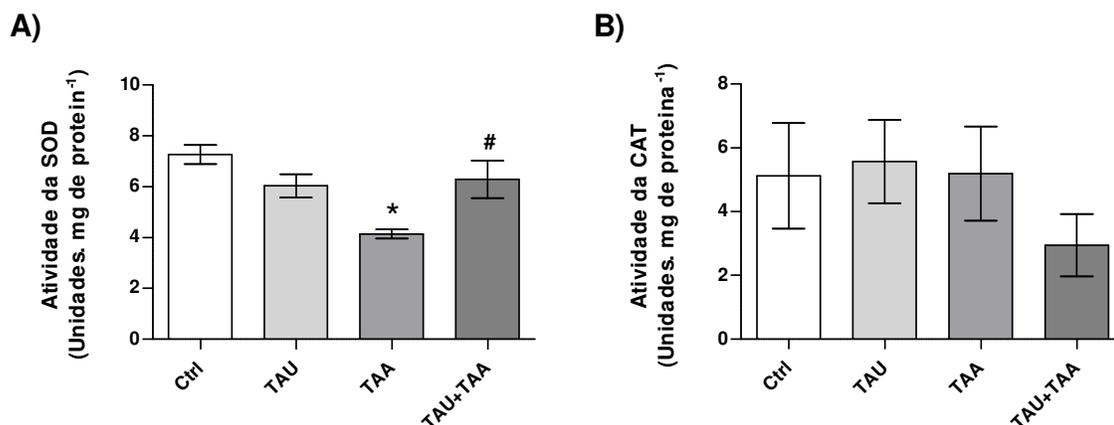


Figura 20 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no tecido hepático.

A) Atividade da enzima SOD. * Diferença entre o grupo controle (Ctrl) e tioacetamida (TAA). # Diferença entre os grupos TAA e cotratamento de taurina e tioacetamida (TAU+TAA). **B)** Atividade da enzima CAT. Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram apresentados como média e erro padrão.

A expressão relativa de mRNA do receptor 2 de adiponectina (ADIPOR2), sirtuina 1 (SIRT1) e TNF- α foram avaliadas no tecido hepático dos peixes (**Figura 21**). A expressão do ADIPOR2 (**Figura 21A**) foi significativamente diferente entre os grupos ($n = 8$; $p = 0,0014$). O grupo TAA teve redução da expressão de ADIPOR2 quando comparado ao controle ($p < 0,05$) e grupo TAU ($p < 0,01$). A expressão de SIRT1 (**Figura 21B**) também apresentou diferença entre os grupos ($n = 8$; $p = 0,0038$). A expressão relativa de mRNA de SIRT1 foi significativamente menor no grupo TAA quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), TAU ($p < 0,05$) e TAU+TAA ($p < 0,01$). A expressão relativa de mRNA de TNF- α (**Figura 21C**) apresentou diferença entre os grupos estudados ($n = 6$; $p < 0,0079$). No grupo TAA foi encontrado aumento significativo nos níveis de mRNA de TNF- α em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) e TAU ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística na expressão desta proteína entre os demais grupos.

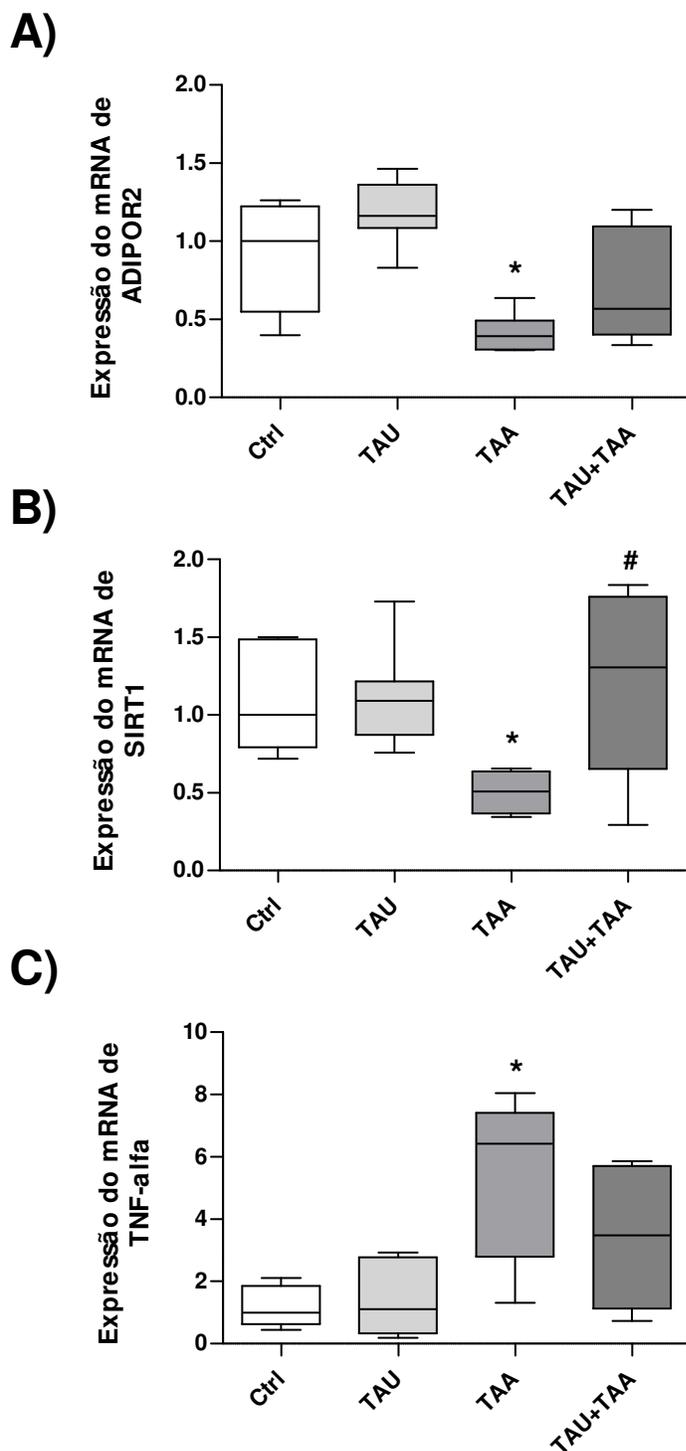


Figura 21 - Efeito da taurina e tioacetamida sobre a expressão de relativa de mRNA de ADIPOR2 (A), SIRT1 (B) e TNF- α (C).

Para testar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Traço largo indica mediana, a caixa representa o intervalo interquartil e a linha vertical indica o valor mínimo e máximo.* Diferença significativa entre o grupo controle (Ctrl) e tioacetamida (TAA). # Diferença entre os grupos TAA e cotratamento de taurina e tioacetamida (TAU+TAA).

DISCUSSÃO

O crescimento exponencial da obesidade tem proporcionado o aumento paralelo de doenças como a DHGNA – ambos os processos estreitamente ligados à resistência à insulina (Tiniakos *et al*, 2010). No Brasil, dados oficiais de 2003 indicam que 40% dos brasileiros adultos apresentavam excesso de peso ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$) e destes 11%, obesidade (BRASIL, 2005). Apesar da estreita relação com obesidade, os dados sobre a prevalência de esteatose hepática na população brasileira ainda são escassos.

Por outro lado, em estudo recente, a Sociedade Brasileira de Hepatologia conduziu um estudo descritivo sobre as características epidemiológicas e clínicas de pacientes adultos com DHGNA de diversos centros médicos do Brasil (Cotrim *et al*, 2011). Nesse estudo, obesidade ou sobrepeso foram observados em aproximadamente 90% dos 1280 pacientes. Em relação ao estágio da DHGNA, 41,9% dos pacientes apresentavam esteatose, 31,1% esteato-hepatite e o restante, esteato-hepatite associada à cirrose ou fibrose.

Este estudo avaliou o efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzida por tioacetamida em Zebrafish. Neste modelo, a taurina promoveu a redução do conteúdo de lipídeos e do estresse oxidativo no tecido hepático. Além disso, o tratamento com este aminoácido resultou em aumento da expressão de SIRT1 em relação ao grupo com esteatose induzida por tioacetamida. No entanto, não foi observada diferença nos triglicerídeos séricos, na atividade da catalase e na

expressão de ADIPOR2 ou TNF- α entre os grupo com indução ao dano e o grupo tratado com taurina.

A taurina preveniu o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos

A exposição à tioacetamida por duas semanas provocou o aumento de lipídeos nos hepatócitos (**Figura 17**). Em seres humanos, é caracterizada, do ponto de vista histológico, DHGNA quando o conteúdo de lipídeos nos hepatócitos é maior que 5% (Law & Brunt, 2010). Em Zebrafish, no entanto, não existe consenso sobre o percentual de acúmulo de lipídeo que pode ser considerado danoso. No presente estudo, consideramos presença de esteatose hepática quando o conteúdo de lipídeos do fígado, avaliado pela técnica de Oil Red O, foi estatisticamente (ANOVA seguido de Tukey; $p < 0,05$) diferente do grupo controle. Neste caso, o grupo TAA teve acúmulo de lipídeo quase 50 vezes maior que o controle.

O acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos sempre foi visto como um evento adverso para o fígado. Estudos recentes, no entanto, têm postulado que a formação de triglicerídeos no hepatócito é um mecanismo utilizado para defender esta célula da lipotoxicidade (Yamaguchi *et al*, 2007; Fujita *et al*, 2009). Obesidade e resistência à insulina são situações que conduzem ao acúmulo de triglicerídeos, pois aumentam a entrega de ácidos graxos livres provenientes da lipólise do tecido adiposo periférico e aumentam a síntese *de novo* no fígado. O aumento do fluxo de ácidos graxos traz prejuízos ao fígado por diferentes formas. O metabolismo microsomal dos ácidos graxos promove o aumento das espécies reativas de oxigênio no hepatócito. A metabolização dos ácidos graxos também pode catalizar a formação de lipoperóxidos, que são diretamente citotóxicos. Além disso, alguns ácidos graxos são ligantes de receptores nucleares e isto pode afetar o padrão

normal de expressão gênica na célula hepática (Yamaguchi *et al*, 2007; Law & Brunt, 2010).

Se a presença de grandes quantidades de triglicerídeos nos hepatócitos é capaz de provocar necroinflamação ou resposta fibrótica ainda não está totalmente esclarecido. De qualquer forma, uma vez que o hepatócito esteja recebendo um aporte exorbitante de ácidos graxos, esse irá transformá-los, preventivamente, em triglicerídeos. Triglicerídeos, dependendo da velocidade de exportação, irão se depositar no hepatócito. Então, ainda que o triglicerídeo intra-hepatocitário possa não provocar dano direto à célula hepática, ele pode ser considerado um marcador de presença de agente lesivo – neste caso – de ácidos graxos livres.

Por outro lado, o tratamento com taurina reduziu a intensidade da esteatose hepática em relação ao grupo TAA, sem diferença estatística com o grupo controle. Este achado está de acordo com diversos trabalhos desenvolvidos em outros modelos animais (Dogru-Abbasoglu *et al*, 2001; Balkan *et al*, 2005). Chen & colaboradores observaram redução na esteatose hepática em ratos tratados com taurina e induzidos à esteato-hepatite por dieta hiperlipídica (Chen *et al*, 2006). Outro estudo obteve o mesmo desfecho em modelo murino de dano hepático por etanol (Chen *et al*, 2008). Com lesão hepática induzida por tioacetamida, a taurina também mostrou efeito protetor frente à necrose hepatocelular em ratos (Dogru-Abbasoglu *et al*, 2001).

A hipertrigliceridemia é um importante fator de risco para infiltração gordurosa no fígado (Assy *et al*, 2000). Como dito anteriormente, uma das maneiras de o fígado lidar com o excesso de fluxo de ácidos graxos é formando triglicerídeos e os exportando na forma de VLDL. Curiosamente, a inibição da oxidação lipídica não parece alterar a secreção de VLDL, mas sim aumentar o conteúdo hepático de

triglicerídeo, ou seja, o aumento de exportação de triglicerídeo pode não ser o mecanismo de escolha contra o acúmulo de lipídeo intra-hepatocitário (Duivenvoorden *et al*, 2005). No presente estudo, não foi encontrada diferença nos níveis de triglicerídeos séricos entre os grupos. Os estudos disponíveis que utilizam TAA como indutor de esteatose não avaliaram o conteúdo sérico de triglicerídeo (Dogru-Abbasoglu *et al*, 2001; Balkan *et al*, 2005). Mas, Chen e colaboradores, citado anteriormente, observaram diferença no nível de triglicerídeos séricos entre o grupo que teve tratamento com taurina comparado ao modelo de esteatose, apesar de não observar diferença entre o grupo com esteatose e o controle (Chen *et al*, 2006).

Estresse oxidativo e taurina

Alguns autores têm reportado um efeito antioxidante da taurina (Schaffer *et al*, 2009; Lakshmi Devi & Anuradha, 2010). Nesta pesquisa observamos efeito protetor da taurina frente à peroxidação de lipídeos induzida por tioacetamida, avaliado por TBARS. Além disso, o tratamento com taurina também aumentou a atividade da SOD, sem alteração da atividade da catalase, em relação ao grupo com dano hepático induzido por tioacetamida. Apesar dos progressos nos estudos com Zebrafish, até o momento, não existem estudos que avaliem o efeito da taurina sobre estresse oxidativo hepático neste modelo. O papel da taurina sobre o estresse oxidativo cerebral foi avaliado recentemente por Rosemberg & colaboradores (Rosemberg *et al*, 2010). Estes autores observaram que a taurina foi capaz de prevenir o aumento do dano peroxidativo aos lipídeos e das alterações enzimáticas (SOD e CAT) induzidas por etanol (Rosemberg *et al*, 2010). Especificamente no fígado, diversos autores reportaram um efeito protetor da taurina frente ao estresse

oxidativo em modelo murino (Kerai *et al*, 1998; Oliveira *et al*, 2010). Em modelo de cirrose hepática induzida por tioacetamida, a taurina mostrou ser capaz de reduzir o conteúdo de malondialdeído no fígado sem, no entanto, alterar a atividade da SOD (Balkan *et al*, 2001). O pré-tratamento com taurina também promoveu redução no conteúdo de lipídeos peroxidados em modelo de dano hepático agudo por tioacetamida. Mais uma vez a atividade da SOD não sofreu alteração significativa (Dogru-Abbasoglu *et al*, 2001). Já no modelo de esteatose hepática por aumento de lipídeos e colesterol dietéticos, a taurina promoveu o aumento das defesas antioxidantes (SOD e CAT) e a redução da lipoperoxidação nos ratos com adição de 0,35 a 0,7% de taurina à água (Chang *et al*, 2011).

Processos fisiológicos normais do hepatócito podem produzir espécies reativas de oxigênio, incluindo respiração oxidativa, crescimento e regeneração celular, apoptose, oxidação de lipídeos, metabolização de drogas pelo sistema microsomal, biossíntese de prostaglandinas, entre outros. Nestes processos, o oxigênio molecular (O_2) é reduzido formando o radical superóxido (O_2^-) – um composto altamente reativo. Além do superóxido, diversos outros compostos reativos podem ser gerados, dentre os quais Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) (Gambino *et al*, 2011). Normalmente, a redução completa do O_2 até H_2O ocorre na mitocôndria e a reatividade dos intermediários é neutralizada pela entrada de 4 elétrons (**Figura 22**).

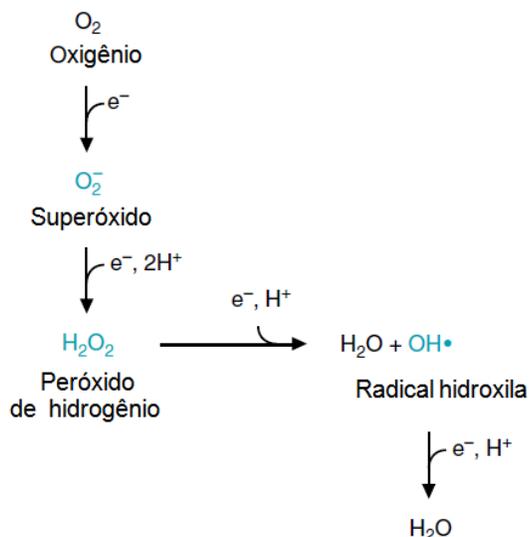


Figura 22 - Redução tetravalente do oxigênio.

O oxigênio é capaz de aceitar 4 elétrons (e^-), que o reduzem até água. Quando o O_2 aceita um elétron, o superóxido é formado. Esta reação, em presença de um agente redutor (próton H^+) forma o peróxido de hidrogênio, que não é um radical. Este peróxido aceita mais um elétron, formando o radical hidroxila que se reduz a água.

Fonte: Adaptado de (Smith *et al*, 2004a).

Os radicais de oxigênio podem produzir disfunção celular, pois reagem com lipídeos, proteínas e carboidratos, extraíndo elétrons e provocando danos à estrutura dessas macromoléculas. As espécies reativas de oxigênio também produzem radicais livres. Por definição, um radical livre pode ser qualquer átomo ou molécula, não necessariamente o oxigênio, que possui elétrons desemparelhados na última camada de energia. Um radical livre pode interagir com outra molécula não radical produzindo um novo radical livre com o mesmo potencial da molécula iniciadora – resultando em uma reação em cadeia. Um exemplo desta reação em cadeia é a peroxidação de lipídeos (Smith *et al*, 2004a).

A fim de conter a toxicidade gerada pelas espécies reativas de oxigênio, o organismo humano, assim como o dos peixes, produz enzimas de defesa antioxidante: a *superóxido dismutase*, a *catalase* e a *glutathiona peroxidase* (**Figura**

24). O estresse oxidativo ocorre quando existe um abalo no equilíbrio entre produção de espécies reativas e defesas antioxidantes (Smith *et al*, 2004a).

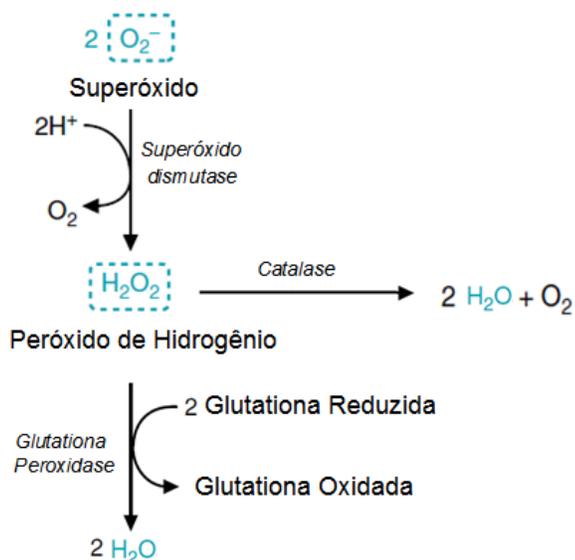


Figura 23- Ação das enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de (Smith *et al*, 2004a).

Concordamos com Oliveira & colaboradores quantos estes afirmam que a disfunção mitocondrial tenha um papel central na progressão da DHGNA (Oliveira *et al*, 2006). A disfunção mitocondrial, caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, promove a liberação de diversas proteínas, o rompimento da cadeia respiratória, a perda da integridade funcional e a produção de radicais livres. Muitas das espécies reativas de oxigênio que são formadas durante a respiração celular e detoxificadas na própria mitocôndria podem extravasar e causar dano aos componentes celulares adjacentes. As lesões hepatocitárias também podem ser causadas por outros mediadores, tais como 4-hidroxinonenal e malondialdeído – metabólitos da lipoperoxidação - desencadeando a síntese de citocinas inflamatórias (Gambino *et al*, 2011). A depleção de DNA mitocondrial

mediada pela toxicidade das espécies reativas de oxigênio pode reduzir o número e a função das mitocôndrias. Esta situação, associada ao aumento de ERO e ao grande fluxo de ácidos graxos livres, promove a saturação da β -oxidação com conseqüente formação de lipoperóxidos, acúmulo de gordura e dano ao hepatócito (Negre-Salvayre *et al*, 2010).

O processo inflamatório parece estar implicado na gênese do estresse oxidativo extracelular encontrado na DHGNA (Gambino *et al*, 2011). Uma das principais moléculas liberadas após o recrutamento e ativação dos fagócitos é a mieloperoxidase (MPO), enzima presente unicamente em fagócitos. Em condições fisiológicas, esta enzima promove a formação do ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio. Esse ácido é potencialmente tóxico e capaz de destruir bactérias em segundos (Smith *et al*, 2004a). Já em condições patológicas, como a esteato-hepatite, o sistema mieloperoxidase- H_2O_2 pode formar espécies reativas de nitrogênio, iniciando a peroxidação de lipídeos (Gambino *et al*, 2011).

Pautados nessa lógica, vários autores utilizam antioxidantes na tentativa de reduzir a esteatose e a esteato-hepatite. De fato, no presente estudo, a taurina mostrou ser capaz de reduzir o conteúdo de lipoperóxidos – confirmando as teorias que a apontavam como antioxidante. Embora o exato mecanismo desta ação antioxidante não esteja claro, este parece estar relacionado à sua atividade como *scavenger*. Recentemente, em estudo realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Oliveira & colaboradores observaram que a taurina foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e proteger o tecido hepático da oxidação dos grupos tiol, *in vitro*. (Oliveira *et al*, 2010). A habilidade da taurina em neutralizar o ácido hipocloroso - através da formação de Taurina-cloramina - também pode atenuar o dano ao DNA induzido por compostos aromáticos de amina

(Kozumbo *et al*, 1992). Apesar de a atividade direta de redução da toxicidade de um composto potencialmente oxidante, o complexo taurina-cloramina parece modular o sistema imune por reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (Schuller-Levis & Park, 2004). Os resultados deste estudo em relação a atividade de SOD sugerem que a taurina possa reduzir o dano aos lipídeos por diminuir a reatividade do ânion superóxido.

Efeito da taurina na expressão do mRNA de proteína inflamatórias e do metabolismo de lipídeos

O avanço das pesquisas sobre DHGNA tem reforçado que seu aparecimento/progressão está relacionado à resistência à insulina, por esse motivo, as rotas metabólicas ligadas a esta condição têm ganhado grande destaque (Rabelo *et al*, 2010). Apesar de direcionados, os estudos englobam um largo espectro de genes como candidatos a gene-chave na DHGNA, ainda sem consenso. Deste universo, elegemos para estudo os genes SIRT1, ADIPOR2 e TNF- α .

O TNF- α é uma proteína pró-inflamatória, secretada por diversas células, tais como, hepatócitos e adipócitos. Como uma citocina pleiotrópica, o TNF- α pode ativar diferentes vias de sinalização como a apoptose hepatocitária, a ativação das células estrelada hepáticas e o recrutamento de células inflamatórias (Jou *et al*, 2008). De fato, no segundo *hit* da esteatose, a expressão de TNF- α e de outras proteínas pró-inflamatórias está bem descrita (Day, 2002). Em ratos, autores encontraram aumento na expressão de TNF- α em modelo de esteatose hepática (Kaser *et al*, 2005; Sundaresan *et al*, 2010). Uma das consequências desse aumento é o desenvolvimento ou agravamento da resistência à insulina, através da ativação de proteínas cinases, tais como *I-kappa-B kinase beta* (IKK- β) e *c-Jun N-terminal kinase*

(JNK). Estas proteínas são responsáveis pela fosforilação de componentes críticos da cascata de sinalização de insulina e abalos neste equilíbrio podem promover a piora da sensibilidade à insulina (Jou *et al*, 2008). Em Zebrafish, a relação entre TNF- α e esteatose hepática foi observada por Matthews & colaboradores que demonstraram a expressão aumentada de TNF- α em peixes com mutação indutora de esteatose (Matthews *et al*, 2009). Curiosamente, nossos resultados não apontaram redução significativa na expressão de mRNA de TNF- α com o tratamento com taurina, o que difere dos achados de Chen & colaboradores (Chen *et al*, 2006).

Os efeitos deletérios para o hepatócito exercidos pelo TNF- α são antagonizados pela ação da adiponectina. Via ADIPOR2, a adiponectina atua - no fígado - reduzindo a resistência à insulina e a inflamação (por supressão do IKK- β), aumentando a oxidação de ácidos graxos e reduzindo a síntese de triglicerídeos (Anderson & Borlak, 2008). Em seres humanos com DHGNA, os níveis plasmáticos de adiponectina estão reduzidos se comparados a indivíduos saudáveis com IMC e circunferência da cintura semelhantes (Musso G, 2005). Em pacientes com esteato-hepatite, a expressão hepática de mRNA de adiponectina e ADIPOR2 é menor em comparação a pacientes com esteatose hepática apenas (Kaser *et al*, 2005). Ratos com esteatose alcoólica também apresentam supressão da expressão de ADIPOR2 em relação ao controle (Ajmo *et al*, 2008). Acredita-se que a SIRT1 esteja envolvida no mecanismo de regulação da expressão de ADIPOR2 isso por que altos níveis deste receptor foram encontrados em fígados de ratos transgênicos com expressão aumentada de SIRT1, em relação aos ratos *wild-type* (Banks *et al*, 2008). Corroborando com esse achado, a expressão de ADIPOR2 parece aumentar com a administração de resveratrol, um potente ativador de SIRT1 (Ajmo *et al*, 2008; Feige *et al*, 2008). Em nosso estudo, embora tenha sido observada redução da esteatose

hepática e aumento dos níveis de mRNA de SIRT1 com administração de taurina, esses achados não foram acompanhados do acréscimo na expressão de ADIPOR2 no tecido hepático de Zebrafish.

As alterações na expressão de SIRT1 têm sido alvo de questionamentos quanto a sua importância frente a diversos processos metabólicos. No que tange a DHGNA, a SIRT1 tem suscitado especial interesse. Recentemente, Colak & colaboradores publicaram uma instigante revisão sobre o seu possível papel na terapêutica da esteatose (Colak *et al*, 2011). Todo esse interesse está alicerçado nos efeitos conhecidos da SIRT1 sobre metabolismo energético e de lipídeos (Figura 25).

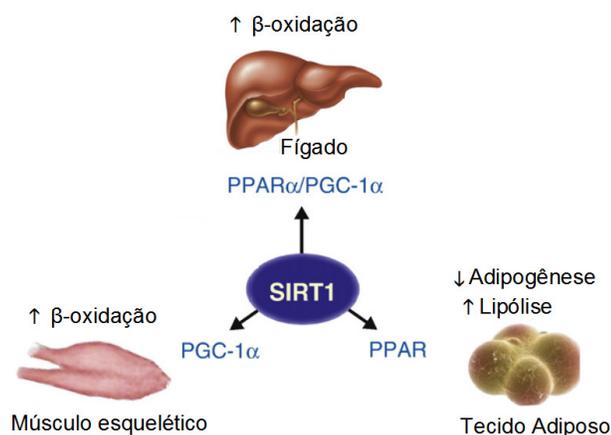


Figura 24- Efeitos da SIRT1 sobre o metabolismo de lipídeos.

PPAR α (Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos α); PGC-1 α (Coativador-1 α do Receptor Ativador da Proliferação de Peroxissomos).

Fonte: Adaptado de (Lomb *et al*, 2010).

O interesse pela família das Sirtuínas começou há cerca de 30 anos, quando a *Sir2* foi descoberta em *Saccharomyces cerevisie* (Klar *et al*, 1979) (Rine & Herskowitz, 1987). Originalmente, essa proteína foi chamada de MAR1 (Mating-type regulator). Mais tarde, foi observado que estas elas estavam envolvidas no silenciamento de alguns genes através de sua atividade como deacetilase, o que

originou a nomenclatura *Sir* (***Silent Information Regulator***). O termo *Sirtuin* foi, então, derivado da *Sir2* (***Silent Information Regulator Two protein***).

As Sirtuínas são filogeneticamente conservadas desde as bactérias até os seres humanos. Elas regulam funções de deacetilases tanto em histonas como em outras proteínas, como p53, NF- κ B, *forkhead transcription factor* (FOXO) e PGC-1 α . Existem sete homólogos em humanos (SIRT1-7) e, em Zebrafish, estes genes estão conservados (Gan, 2010; Pereira *et al*, 2011).

A SIRT1 é a isoforma mais estudada em seres humanos e sua ativação está associada à restrição calórica e ao aumento da longevidade (Yang *et al*, 2006; Civitarese *et al*, 2007). O aumento na disponibilidade de NAD⁺ promove a ativação da SIRT1, o que é consistente com a sua relação com deprivação energética (Smith *et al*, 2008). Em situação de jejum, as rotas metabólicas relacionadas à geração de energia estão ativadas, como lipólise, proteólise, gliconeogênese e glicólise nos tecidos periféricos. Todas estas rotas fornecem substrato para o ciclo de Krebs, ativando-o e aumentando a razão entre NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida) e NAD⁺. O NADH é consumido na cadeia respiratória produzindo NAD⁺ (Smith *et al*, 2004b). É por esse mecanismo que o jejum resulta no aumento da atividade de deacetilase da SIRT1, que é uma enzima NAD⁺-dependente. Assim, compreende-se por que os estudos associam a SIRT1 a homeostase glicêmica, mobilização de lipídeos, β -oxidação e sensibilização à insulina (Colak *et al*, 2011).

Em relação à DHGNA, a ativação da SIRT1 parece exercer um efeito protetor. A expressão protéica de SIRT1 parece estar reduzida na esteatose hepática, tanto alcoólica quanto não alcoólica (Deng *et al*, 2007; You *et al*, 2008). Ratos *knockout* específicos para SIRT1 hepática, quando expostos à dieta com alto teor de lipídeos, desenvolvem esteatose, inflamação e estresse no retículo

endoplasmático do fígado (Purushotham *et al*, 2009). Por outro lado, animais com dieta hiperlipídica tratados com um potente ativador sintético de SIRT1 apresentaram redução da esteatose hepática, aumento na expressão de SIRT1 e de ADIPOR2 (Feige *et al*, 2008). A gravidade da esteatose hepática também guarda relação com a expressão de SIRT1 no tecido adiposo visceral. Avaliando pacientes adultos de ambos os sexos com obesidade grau III, Costa & colaboradores observaram que os indivíduos com esteatose hepática grave apresentaram níveis menores de SIRT1 no tecido adiposo visceral do que aqueles com esteatose leve ou moderada. No presente estudo, a esteatose induzida por tioacetamida em Zebrafish apresentou redução na expressão de SIRT1 e ADIPOR2 o que foi acompanhado de aumento na expressão de mRNA de TNF- α .

O efeito da taurina sobre a expressão de SIRT1 não havia sido estudado até a realização do presente estudo. Apesar de o grupo TAU+TAA apresentar aumento na expressão de SIRT1 quando comparado ao TAA, os experimentos que realizamos não nos permitem afirmar que exista uma modulação direta da taurina sobre a SIRT1. No entanto, Banks e colaboradores concluíram que a ativação da SIRT1 promove a indução de proteínas antioxidantes, como a SOD, e reduz a expressão de citocinas inflamatórias, via regulação negativa do NF κ B (Banks *et al*, 2008). Dessa forma, sugerimos que a ativação da SIRT1, encontrada no grupo TAU+TAA, tenha conferido um efeito protetor via redução do estresse oxidativo e da inflamação.

Em resumo, os resultados deste estudo revelam que a taurina é capaz de reduzir a esteatose hepática, diminuindo o estresse oxidativo e prevenindo a redução de SIRT1 em modelo de esteatose induzida por tioacetamida em Zebrafish adulto, *wild-type*.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1) Quanto ao modelo:

- Foi possível a reprodução do modelo de esteatose hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*, adulto, *wild-type*;

2) Quanto ao tratamento com taurina:

- A taurina foi capaz de reduzir o acúmulo de lipídeos no fígado, induzido com as injeções intraperitoneais de tioacetamida;

- A lipoperoxidação hepática induzida pela administração de tioacetamida foi prevenida com o coadministração com taurina;

- A atividade da SOD foi restaurada com o coadministração de taurina;

- A taurina não exerceu efeito sobre a atividade de CAT e sobre os níveis de triglicerídeos séricos;

- A taurina não reverteu o aumento da expressão de TNF- α e a redução da expressão de ADIPOR2, observada no grupo com administração de tioacetamida

- A taurina foi capaz de evitar a redução da expressão de SIRT1 observada na esteatose induzida por tioacetamida.

Em suma, concluímos que a taurina é capaz de reduzir a esteatose hepática, por diminuir o estresse oxidativo e prevenir a redução de SIRT1 em modelo de esteatose induzida por tioacetamida em Zebrafish adulto, *wild-type*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmalek MF, Diehl AM. De novo nonalcoholic fatty liver disease after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007. 13(6): 788-90.
- Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008. 295(4): G833-42.
- Amali AA, Rekha RD, Lin CJ, et al. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci.* 2006. 13(2): 225-32.
- American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002. 123(5): 1702-4.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008. 60(3): 311-57.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002. 346(16): 1221-31.
- Assy N, Kaita K, Mymin D, et al. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci.* 2000. 45(10): 1929-34.
- Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, et al. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2001. 20(5): 251-4.
- Balkan J, Parldar FH, Dogru-Abbasoglu S, et al. The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by lipopolysaccharide treatment in the liver of rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005. 17(9): 917-21.
- Banks AS, Kon N, Knight C, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 2008. 8(4): 333-41.
- Baskaran Y, Periyasamy V, Venkatraman AC. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology.* 2010. 268(3): 204-12.
- Bitencourt AG, Cotrim HP, Alves E, et al. [Nonalcoholic fatty liver disease: clinical and histological characteristics in obese who underwent bariatric surgery]. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2007. 37(4): 224-30.
- Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006. 9(6): 728-33.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973. 134(3): 707-16.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-54.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Brasília, 2005. 236 p.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004. 40(6): 1387-95.
- Brueton MJ, Berger HM, Brown GA, et al. Duodenal bile acid conjugation patterns and dietary sulphur amino acids in the newborn. *Gut*. 1978. 19(2): 95-8.
- Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010. 16(42): 5286-96.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978. 52: 302-10.
- Carazo A, Leon J, Casado J, et al. Hepatic expression of adiponectin receptors increases with non-alcoholic fatty liver disease progression in morbid obesity in correlation with glutathione peroxidase 1. *Obes Surg*. 2011. 21(4): 492-500.
- Chang YY, Chou CH, Chiu CH, et al. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit. *J Agric Food Chem*. 2011. 59(1): 450-7.
- Chen SW, Chen YX, Shi J, et al. The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2006. 51(12): 2225-34.
- Chen X, Sebastian BM, Tang H, et al. Taurine supplementation prevents ethanol-induced decrease in serum adiponectin and reduces hepatic steatosis in rats. *Hepatology*. 2008. 49(5): 1554-62.
- Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010. 26(3): 202-8.
- Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, et al. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*. 2007a. 230(2-3): 105-116.
- Chilakapati J, Korrapati MC, Shankar K, et al. Role of CYP2E1 and saturation kinetics in the bioactivation of thioacetamide: Effects of diet restriction and phenobarbital. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007b. 219(1): 72-84.
- Chilakapati J, Shankar K, Korrapati MC, et al. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos*. 2005. 33(12): 1877-85.
- Chu J, Sadler KC. New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology*. 2009. 50(5): 1656-63.
- Civitaresse AE, Carling S, Heilbronn LK, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med*. 2007. 4(3): e76.
- Colak Y, Ozturk O, Senates E, et al. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit*. 2011. 17(5): HY5-9.
- Collins FS, Gray GM, Bucher JR. Toxicology. Transforming environmental health protection. *Science*. 2008. 319(5865): 906-7.

- Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011. 10(1): 33-7.
- Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009. 16(2): 141-9.
- David P, Alexandre E, Chenard-Neu MP, et al. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. *Lab Anim*. 2002. 36(2): 158-64.
- Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002. 16(5): 663-78.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998. 114(4): 842-5.
- de Moura Almeida A, Cotrim HP, Barbosa DB, et al. Fatty liver disease in severe obese patients: diagnostic value of abdominal ultrasound. *World J Gastroenterol*. 2008. 14(9): 1415-8.
- de Oliveira CP, de Mello ES, Alves VA, et al. Changes in histological criteria lead to different prevalences of nonalcoholic steatohepatitis in severe obesity. *Ann Hepatol*. 2007. 6(4): 255-61.
- Deng XQ, Chen LL, Li NX. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int*. 2007. 27(5): 708-15.
- Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Balkan J, et al. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Hum Exp Toxicol*. 2001. 20(1): 23-7.
- Donovan JM, Konikoff FM. Gallstone Disease: Pathogenesis and treatment. In: Schiff E, Sorrel MF and Maddrey WC (Org). *Diseases of the liver*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1:139-147.
- Duivenvoorden I, Teusink B, Rensen PC, et al. Acute inhibition of hepatic beta-oxidation in APOE*3Leiden mice does not affect hepatic VLDL secretion or insulin sensitivity. *J Lipid Res*. 2005. 46(5): 988-93.
- Erman F, Balkan J, Cevikbas U, et al. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication. *Amino Acids*. 2004. 27(2): 199-205.
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*. 2008. 8(5): 347-58.
- Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. *Animais na Pesquisa e no Ensino: Aspectos Éticos e Técnicos*. 2010. Porto Alegre, EDIPUCRS. 421 p.
- Franconi F, Loizzo A, Ghirlanda G, et al. Taurine supplementation and diabetes mellitus. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2006. 9(1): 32-6.
- Fujita K, Nozaki Y, Wada K, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology*. 2009. 50(3): 772-80.

- Gambino R, Musso G, Cassader M. Redox Balance in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011.
- Gan L. Therapeutic potential and challenges of targeting sirtuins in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Biology*. 2010. 5(4): 324-330.
- Gao H, Wang Y, Wegierski T, et al. PRKCSH/80K-H, the protein mutated in polycystic liver disease, protects polycystin-2/TRPP2 against HERP-mediated degradation. *Hum Mol Genet*. 2010. 19(1): 16-24.
- Hashimoto E, Tokushige K. Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. *J Gastroenterol*. 2010. 46 Suppl 1: 63-9.
- Hinton DE, Couch JA. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. *Exs*. 1998. 86: 141-64.
- Holtta-Vuori M, Salo VT, Nyberg L, et al. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem J*. 2010. 429(2): 235-42.
- Hsu TC, Chiang SY, Wu JH, et al. Treatment with taurine attenuates hepatic apoptosis in NZB/W F1 mice fed with a high-cholesterol diet. *J Agric Food Chem*. 2008. 56(20): 9685-91.
- Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev*. 1992. 72(1): 101-63.
- IARC (1974). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals. . International Agency for Research on Cancer. Acesso em: 20 de novembro de 2010. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol7/volume7.pdf>
- Johnson NA, George J. Fitness versus fatness: moving beyond weight loss in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010. 52(1): 370-81.
- Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008. 28(4): 370-9.
- Kaser S, Moschen A, Cayon A, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005. 54(1): 117-21.
- Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, et al. Taurine: protective properties against ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation during chronic ethanol consumption in rats. *Amino Acids*. 1998. 15(1-2): 53-76.
- Kinkel AD, Fernyhough ME, Helterline DL, et al. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*. 2004. 46(1): 49-56.
- Kinkel MD, Eames SC, Philipson LH, et al. Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. *J Vis Exp*. 2010. (42): e2126.
- Klar AJ, Fogel S, Macleod K. MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics*. 1979. 93(1): 37-50.

- Korz S, Pan X, Garcia-Lecea M, et al. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Developmental Biology*. 2008. 8(1): 84.
- Kozlowski DJ, Chen Z, Zhuang L, et al. Molecular characterization and expression pattern of taurine transporter in zebrafish during embryogenesis. *Life Sciences*. 2008. 82(19-20): 1004-1011.
- Kozumbo WJ, Agarwal S, Koren HS. Breakage and binding of DNA by reaction products of hypochlorous acid with aniline, 1-naphthylamine, or 1-naphthol. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992. 115(1): 107-15.
- Lakshmi Devi S, Anuradha CV. Mitochondrial damage, cytotoxicity and apoptosis in iron-potentiated alcoholic liver fibrosis: amelioration by taurine. *Amino Acids*. 2010. 38(3): 869-79.
- Lam SH, Wu YL, Vega VB, et al. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol*. 2006. 24(1): 73-5.
- Lamonica-Garcia VC, Marin FA, Lerco MM, et al. [Plasma taurine levels in patients with esophagus cancer]. *Arq Gastroenterol*. 2008. 45(3): 199-203.
- Law K, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2010. 14(4): 591-604.
- Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis*. 2008. 28(4): 339-50.
- Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010. 55(3): 560-78.
- Liang X, Hu M, Rogers CQ, et al. Role of SIRT1-FoxO1 Signaling in Dietary Saturated Fat-Dependent Up-Regulation of Liver Adiponectin Receptor 2 in Ethanol-Administered Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2010. 15(2): 425-35.
- Lima ML, Mourao SC, Diniz MT, et al. Hepatic histopathology of patients with morbid obesity submitted to gastric bypass. *Obes Surg*. 2005. 15(5): 661-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25(4): 402-8.
- Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010. 1804(8): 1652-7.
- Lorent K, Yeo SY, Oda T, et al. Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy. *Development*. 2004. 131(22): 5753-66.
- Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, et al. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr*. 2010. 140(6): 1127-32.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. 2002. 8(7): 731-7.

- Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Tissue-Repair Response as a Function of Dose in Thioacetamide Hepatotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1995. 103(3): 260-267.
- Matthews RP, Eauclaire SF, Mugnier M, et al. DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia. *Hepatology*. 2010. 53(3): 905-14.
- Matthews RP, Lorent K, Manoral-Mobias R, et al. TNFalpha-dependent hepatic steatosis and liver degeneration caused by mutation of zebrafish S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Development*. 2009. 136(5): 865-75.
- Mayden RL, Tang KL, Conway KW, et al. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2007. 308B(5): 642-654.
- McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today*. 2008. 13(9-10): 394-401.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972. 247(10): 3170-5.
- Musso G, Gambino R, Cassader M, et al. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010. 52(1): 79-104.
- Musso G GR, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology*. 2005. (42): 1175-1183.
- Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2010. 44(10): 1125-71.
- Oh MK, Winn J, Poordad F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008. 28(5): 503-22.
- Oja SS, Saransaari P, Han X, et al. Mechanisms of Regulation of Taurine Transporter Activity. In: (Org). *Taurine 6*. Springer US, 2006. 583:79-90.
- Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro HV, et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006. 39(2): 189-94.
- Oliveira MW, Minotto JB, de Oliveira MR, et al. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol Rep*. 2010. 62(1): 185-93.
- Parnig C, Seng WL, Semino C, et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol*. 2002. 1(1 Pt 1): 41-8.
- Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009. 49(2): 443-52.

- Pereira TCB, Rico EP, Rosemberg DB, et al. Zebrafish as a Model Organism to Evaluate Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression. *Zebrafish*. 2011. 8(1): 9-16.
- Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(28): 9793-8.
- Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clinical Science*. 2008. 115(5): 141-150.
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009. 9(4): 327-38.
- Rabelo F, Oliveira C, Faintuch J, et al. Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Steatosis and Steatohepatitis. *Obesity Surgery*. 2010. 20(7): 906-912.
- Rekha RD, Amali AA, Her GM, et al. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology*. 2008. 243(1-2): 11-22.
- Report on Carcinogens. Eleventh Edition; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 2005.
- Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1987. 116(1): 9-22.
- Rosemberg DB, da Rocha RF, Rico EP, et al. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*. 2010. 171(3): 683-92.
- Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg*. 2007. 17(10): 1374-80.
- Sadler KC, Amsterdam A, Soroka C, et al. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants *vps18*, *nf2* and *foie gras* as models of liver disease. *Development*. 2005. 132(15): 3561-72.
- Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002. 123(5): 1705-25.
- Schaffer S, Takahashi K, Azuma J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*. 2000. 19(3-4): 527-46.
- Schaffer SW, Azuma J, Mozaffari M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009. 87(2): 91-9.
- Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, et al. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci*. 2010. 17 Suppl 1: S2.
- Schneider ACR, Santos JLD, Porawski M, et al. Implementação de um novo modelo de experimentação animal - Zebrafish. *Revista HCPA*. 2009. 29(9).

- Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2003. 226(2): 195-202.
- Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res.* 2004. 29(1): 117-26.
- Schuppan D, Gorrell MD, Klein T, et al. The challenge of developing novel pharmacological therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2010. 30(6): 795-808.
- Sheridan MA. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol B.* 1988. 90(4): 679-90.
- Sheridan MA. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* 1994. 107(4): 495-508.
- Sherlock S, Dooley J. Anatomy and Function. In: Sherlock S and Dooley J (Org). *Diseases of the Liver and Biliary System.* Oxford: Blackwell Science, 2002. 1-17.
- Shetty TK, Narurkar LM, Narurkar MV. Cytoplasmic changes during thioacetamide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Br J Cancer.* 1971. 25(1): 109-20.
- Shieh YS, Chang YS, Hong JR, et al. Increase of hepatic fat accumulation by liver specific expression of Hepatitis B virus X protein in zebrafish. *Biochim Biophys Acta.* 2010. 1801(7): 721-30.
- Smith BC, Hallows WC, Denu JM. Mechanisms and molecular probes of sirtuins. *Chem Biol.* 2008. 15(10): 1002-13.
- Smith C, Marks A, Lieberman MA. Oxygen Toxicity and Free Radical Injury. In: (Org). *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.* Lippincott Williams & Wilkins, 2004a. 439-457.
- Smith C, Marks A, Lieberman MA. Tricarboxylic Acid Cycle. In: (Org). *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.* Lippincott Williams & Wilkins, 2004b. 360-396.
- Sturman JA. Taurine in development. *J Nutr.* 1988. 118(10): 1169-76.
- Sullivan S. Implications of diet on nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010. 26(2): 160-4.
- Sundaresan S, Vijayagopal P, Mills N, et al. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr Biochem.* 2010.
- Tao T, Peng J. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Genet Genomics.* 2009. 36(6): 325-34.
- Tasci I, Mas N, Mas MR, et al. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl₄ induced liver injury. *World J Gastroenterol.* 2008. 14(31): 4897-902.
- Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2010. 5: 145-71.

- Tunez I, Munoz MC, Villavicencio MA, et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res.* 2005. 52(3): 223-8.
- Vercelino R, Crespo I, de Souza G, et al. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *Journal of Molecular Medicine.* 2010. 88(4): 401-411.
- Verner A, Craig S, McGuire W. Effect of taurine supplementation on growth and development in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007. (4): CD006072.
- Wanless IR. Physioanatomic Considerations. In: Schiff E, Sorrel MF and Maddrey WC (Org). *Diseases of the liver.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1:181-209.
- Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio).* 2000. Eugene University of Oregon Press. p.
- Wolf JC, Wolfe MJ. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol.* 2005. 33(1): 75-85.
- Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007. 45(6): 1366-74.
- Yang T, Fu M, Pestell R, et al. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2006. 17(5): 186-91.
- You M, Liang X, Ajmo JM, et al. Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008. 294(4): G892-8.
- You M, Rogers CQ. Adiponectin: a key adipokine in alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009. 234(8): 850-9.
- Zhang F, Tong L, Qiao H, et al. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2008. 149(1): 101-9.

ANEXOS

Anexo A - Dados brutos

Controle	Taurina	Tioacetamida	Taurina-tioacetamida
TBARS (mmol . mg de proteína)			
0,691	0,496	1,061	0,484
0,552	0,494	0,997	0,471
0,508	0,44	0,694	0,530
0,556	0,549	0,699	0,525
0,637	0,59	0,917	
	0,47	0,974	
SOD (Unidade de SOD . mg de proteína)			
8,09	5,073	4,559	5,471
6,076	6,605	3,494	5,987
6,876	7,707	4,680	7,518
8,046	5,122	3,845	5,373
7,245	6,676	4,020	5,405
	5,067	4,264	
CAT (Unidade de CAT . mg de proteína)			
7,576	1,778	8,056	3,548
2,882	6,737	1,308	3,614
1,72	6,075	4,58	4,522
8,319	7,691	6,828	0,087
Triglicerídeos (mg/dL)			
436,11	286,11	531,94	443,06
475	593,06	659,72	444,44
398,61	473,61	527,78	654,17
Quantificação do Oil Red (%)			
9,582695	3,617423	507,839	76,64781
7,847453	6,254061	466,9917	134,0568
3,76836	4,245033	300,366	113,538
ADIPOR2			
0,483	1,235	0,502	0,637
0,399		0,462	0,475
0,844	1,113	0,302	1,197
1,227	1,164	0,637	0,376
0,747	1,464	0,303	0,795
1,214	1,086	0,44	0,334
1,261	0,829	0,344	1,201
1,156	1,361	0,32	0,5

Controle	Taurina	Tioacetamida	Taurina-tioacetamida
SIRT1			
0,816	1,047	0,654	1,684
0,788	0,86	0,4	1,158
0,842	1,731	0,364	1,451
1,491	1,138	0,64	0,508
1,158	0,756	0,616	1,836
1,481	1,228	0,629	1,081
1,502	0,905	0,383	1,786
0,718	1,182	0,345	0,292
TNF-α			
1,014	0,395	6,68	
0,782	0,191		0,735
0,455	1,017	7,209	4,377
0,986		1,319	2,593
1,449		8,055	1,257
0,572	2,722	6,168	
1,993	2,928	3,305	5,656
2,114	1,218		5,856

Anexo B – Submission Acknowledgement

de dds.journal@gmail.com

para Thais Ortiz Hammes
<thaisortizhammes@gmail.com>

data 12 de maio de 2011 08:38

assunto Editor and manuscript number
assigned

enviado editorialmanager.com
por

Dear Thais Ortiz Hammes:

Thank you once again for the submission of your manuscript "The effect of Taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in Zebrafish (*Danio rerio*)" to Digestive Diseases and Sciences. Your manuscript has been assigned to an editor and given the following manuscript number: DDAS8711.

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

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

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

With kind regards,

Geetha Subramanian
Springer Journals Editorial Office

Anexo C – Artigo

The effect of Taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in Zebrafish
(*Danio rerio*)

Thais Ortiz Hammes^{1,2}; Gabriela Lima Pedroso^{1,2}, Carolina Rigatti Hartmann¹,
Thayssa Dalla Costa Escobar¹, Laisa Beduschi Fracasso¹, Darlan Pase da Rosa^{1,3},
Norma Possa Marroni^{1,3,4}, Marilene Porawski¹, Themis Reverbel da Silveira^{1,2}

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Centro de Pesquisa Experimental. Laboratório
de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental. Porto Alegre, RS, Brazil

² Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto
Alegre, RS, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia, Universidade Luterana
do Brasil, ULBRA. Canoas, RS, Brazil.

Correspondence to Thais Ortiz Hammes

Address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental – Centro de Pesquisa
Experimental

Rua Ramiro Barcelos 2350 – Centro de Pesquisa Experimental.

CEP 90.035-903. Porto Alegre. RS. Brazil. Tel: 55 51 3359 8847

e-mail: thaisortizhammes@gmail.com

Acknowledgments: This work was financial supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Abstract

Background: Nonalcoholic fatty liver disease is one of the most prevalent forms of chronic liver disease in the Western world. Taurine is a conditionally essential amino acid in humans that may be a promising therapy for treating this disease. **Aim:** To evaluate the effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in *Danio rerio*. **Methods:** Animals were divided into 4 groups: control (20 µl of saline solution), taurine (1000 mg/kg), thioacetamide (300 mg/kg) and the taurine-thioacetamide group (1000 mg/kg plus 300 mg/kg). Thioacetamide was injected intraperitoneally three times a week for 2 weeks. The mRNA expression, lipoperoxidation, antioxidant enzymatic activity and histological analyses were evaluated in the liver and the triglyceride content was assessed in the serum. **Results:** Thioacetamide injection induced steatosis, as indicated by histological analyses. The lipoperoxidation showed significant lipid damage in the thioacetamide group compared to the taurine-thioacetamide group ($P < 0.001$). Superoxide dismutase (SOD) activity in the taurine-thioacetamide group (5.95 ± 0.40) was significantly increased compared to the thioacetamide group (4.14 ± 0.18 U SOD/mg of protein) ($P < 0.001$). The mRNA expression of SIRT1 (0.5-fold) and Adiponectin receptor 2 (0.39-fold) were lower in the thioacetamide group than the control ($P < 0.05$). TNF- α mRNA expression was 6.4-fold higher in the thioacetamide group than control ($P < 0.05$). SIRT1 mRNA expression was 2.6-fold higher in the taurine-thioacetamide group than in the thioacetamide group. **Conclusion:** Taurine seems to improve hepatic steatosis by reducing oxidative stress and increasing SIRT1 expression.

Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been increasingly recognized as the most common form of chronic liver disease in both adults and children [1]. In humans, it is histologically characterized by the accumulation of fat, which is predominantly comprised of, mainly triglycerides, in more than 5% of hepatocytes [2]. It is one of the most prevalent forms of chronic liver disease, and its prevalence is estimated 31% in American adults [3]. In addition, the prevalence increases in risk populations, such as persons with a high waist circumference, obesity, insulin resistance, or diabetes. In Brazil, more than 80% of patients admitted for bariatric surgery have hepatic steatosis [4, 5]. The pathogenesis of hepatic steatosis still remains poorly understood. There is no consensus regarding therapies for NAFLD, and many pharmacological agents are being tested for this purpose [6]. Nevertheless, it is known that free fatty acids (FFA) and adipocytokines, such as TNF- α (Tumor necrosis factor α) and adiponectin have a central role in its development.

Taurine (2-aminoethanesulfur acid) is a conditionally essential amino acid in humans and important for the development of the nervous system, xenobiotic conjugation, osmoregulation, and other processes [7]. Taurine also presents hypolipidemic and antioxidant effects, which is the main reason why it has been tested as a therapeutic agent against steatosis [8]. Interestingly, Chen et al. [9] observed a reduction of oxidative stress, expression of adiponectin and TNF- α , and an improvement of histological parameters of steatosis in rats with nonalcoholic steatohepatitis treated with taurine compared to controls.

Among the animal models currently available for the study of liver diseases, the Zebrafish (*Danio rerio*) has gained prominence for its easy and cheap culture

system, short life cycle and molecular homology with humans [10]. Several authors have used this freshwater fish in experimental studies [11, 12]. Amali et al. recently proposed a model of hepatic steatosis in Zebrafish with intraperitoneal injections of thioacetamide (300 mg/kg), which is a potent hepatotoxic agent [13]. Disease models induced by drugs in Zebrafish are cheaper than mice, because Zebrafish are small organisms that only require limited amounts of drugs to induce disease development [14].

The aim of this study was to evaluate whether taurine treatment has a protective effect on hepatic steatosis induced by thioacetamide in Zebrafish.

Materials and Methods

Animals

One hundred and eight adults *Danio rerio* (3-6 months-old; weight: 334 ± 23.75 mg) of both sexes were purchased from a commercial supplier (Delphis, Brazil) and acclimated to soft water (25-28°C; pH 6.8) over a 14 day period in an aerated 40 L aquarium. After acclimation, Zebrafish were housed in four 10 L aquariums containing 30 fish each. Fish were fed daily with a commercial tropical fish food (Alcon Basic, Brazil) and maintained on a 14:10 hour light-dark photoperiod regimen. Zebrafish were fasted for 24 hours prior to the beginning of experimentation. All procedures used were approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol number 09 393).

Experimental design

Animals were divided into the following four groups: control (Ctrl - 20 μ l of saline solution), taurine (TAU - 1000 mg/kg diluted in 20 μ l of saline solution),

thioacetamide (TAA - 300 mg/kg diluted in 20 µl of saline solution) [12], and a thioacetamide-aurine group (TAU + TAA - 1000 mg/kg plus 300 mg/kg diluted in 20 µl of saline solution). The experiment duration was 2 weeks and the drugs were injected intraperitoneally three times a week. Zebrafish were cryo-anesthetized and sacrificed at the end of the experiment.

Histological analysis

Livers from Zebrafish were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax, sectioned (6 µm), and stained with haematoxylin and eosin (H&E). The liver tissue was also frozen at -20°C, cryosectioned (6 to 8 µm thick), and stained with oil red O to assess the fatty droplet accumulation [15]. The lipid content of pictures of Oil Red slides was quantified with Adobe® Photoshop® CS3 (Adobe Systems, USA) and expressed as pixels per 1000. To quantify the fat positivity by Oil Red O staining, we selected the color representing fat positivity as the foreground color, and the color representing the liver as the background. The value of the foreground and of the sum of the first and second plans were recorded and converted into a percentage.

Biochemical analysis

To evaluate serum triglycerides, twelve animals of each group were cryo-anesthetized and had their blood collected as previously described [16]. Briefly, a transverse incision was made just before the tail, and the blood was immediately collected with an automatic pipette pre-washed with 5 M EDTA. The blood of three pools of 4 animals each was centrifuged for 10 minutes at 3200 RPM (Eppendorf Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany). The serum was collected and triglycerides were analyzed using a colorimetric test (Labtest Diagnóstica, Brazil).

Nine milliliters of phosphate buffer (140 mM KCL, 20 mM sodium phosphate, pH 7.4) per liver tissue gram was added and the tissue was homogenized in an Ultra Turrax (IKA-WERK, Germany) for 40 s at 4°C. It was then centrifuged for 10 minutes at 4000 RPM (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont company, USA). The supernatant was placed into Eppendorf tubes and the precipitate was discarded. The samples were stored at -80°C for posterior analyses.

The amount of aldehydes generated by lipid peroxidation was measured by the thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS). Briefly, the samples were incubated at 100°C for 30 minutes after addition of 0.37% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid and centrifuged at 3000 RPM for 10 minutes at 4°C. Absorbance was determined by a spectrophotometer at 535 nm [17].

The superoxide dismutase (SOD) catalyzes the reaction of two superoxide anions to form hydrogen peroxide, which is less reactive and can be degraded by enzymes such as catalase (CAT). The analysis of SOD is based on the ability of the sample to inhibit the superoxide-mediated adrenaline oxidation [18]. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to inhibit the reaction of oxidation by 50%, and was measured by absorbance at 480 nm and expressed as Unit.mg protein-1. The analysis of CAT activity is base on the sample ability to consume hydrogen peroxide. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme required to consume 1 μmol H₂O₂ in 1 second, and was measured by absorbance at 240 nm and expressed as Unit.mg protein-1 [19]. Four pools of 5 livers were used for all biochemical analyses. The protein content was evaluated by the Bradford method using bovine albumin as the standard (Sigma-Aldrich, USA). The absorbance was measured with a spectrophotometer at 595 nm and all biochemical analyses were normalized by protein content [20].

Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

The liver samples (n = 8) from each fish were obtained by microsurgery and immediately immersed in TRIZOL reagent (Invitrogen, USA). Total RNA was isolated according to the manufacturer's instruction and the concentrations were quantified by UV spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA) at 260 nm. RNA purity was verified by a 260/280 nm ratio of 1.8 or greater. First strand cDNA was synthesized from 800 ng of total RNA using the Superscript™ II RT system (Invitrogen, USA). Gene expression analysis was performed in duplicate on a Stratagene MX3000P real-time PCR machine using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) for the following genes: Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α ; NM_212859.2), Adiponectin Receptor 2 (ADIPOR2; NM_001025506.2), Sirtuin 1 (SIRT1; ENSDART00000098209) and Elongation Factor 1-alpha (EF1- α ; NM_131263.1). PCR was performed with 10 μ l of TaqMan Gene Expression PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 5 μ M of the probe, 18 μ M of each primer, 4 μ l of diluted cDNA (100ng), and 5 μ l of RNase-free water in a 20 μ l final reaction mixture. The two-step PCR conditions were as follows: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, and 40 cycles with 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C.

Gene expression was quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (threshold cycle) method [21]. Each sample was analyzed in duplicate and a ΔCt value was obtained by subtracting the elongation factor- α CT value from the CT value of the gene of interest. To calculate the difference between groups, the ΔCt mean value obtained for the control group was used to calculate the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of each gene ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using Prism 5 (Graph Pad, San Diego, USA). Distributions were first tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Multiple comparisons between Gaussian distributions were performed using 1-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc tests. For non-normal distributions, the Kruskal-Wallis test was used with Dunn post hoc tests for multiple comparisons. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Taurine promotes change in hepatic lipid content

There was an increase of lipid content in the livers of animals receiving a TAA injection (Figure 1 and 2), which was determined by measuring the number of pixels that corresponded to fat positivity by Oil Red staining ($n = 3$; $P < 0.0001$). The TAA group had a significantly greater content of lipids in the liver than the control ($P < 0.001$), TAU ($P < 0.001$), and TAU + TAA ($P < 0.001$) groups. There was no difference in serum triglycerides between the groups ($n = 3$).

Taurine prevents hepatic lipoperoxidation

To evaluate the peroxidative damage in hepatic lipids, we used the TBARS method (Figure 3A). After fifteen days, lipid peroxidation was significantly different between the groups ($n = 5$; $P < 0.0001$). The TAA group showed higher levels of lipoperoxidation compared to the control ($P < 0.001$) and taurine group ($P < 0.001$). Importantly, the TAU + TAA group was effective in preventing TAA-induced lipid oxidation ($P < 0.001$).

Taurine alters SOD but not CAT activity

The antioxidant defenses were evaluated by determining SOD (Figure 3B) and CAT (Figure 3C) enzyme activities. Exposure to TAA for two weeks significantly reduced the SOD activity ($n = 5$) when compared to the control ($P < 0.001$) and TAU group ($P < 0.01$). Treatment of these fish with taurine (the TAU + TAA group) prevented the TAA-mediated SOD inhibition ($P < 0.001$). In contrast, CAT showed no statistically significant changes in its activity profile between the groups ($n = 4$).

The effect of taurine on the expression of cytokine mRNA

The relative mRNA expression of ADIPOR2 (Figure 4A), SIRT1 (Figure 4B), and TNF- α (Figure 4C) in hepatic tissue was analyzed by qRT-PCR. The Kruskal-Wallis test revealed a statistically significant difference in mRNA expression of ADIPOR2 ($P = 0.0014$), SIRT1 ($P = 0.0038$), and TNF- α ($P = 0.0079$) between the groups. The expression of ADIPOR2 was lower in the TAA group than in the control ($P < 0.05$) and TAU ($P < 0.01$) groups; however, no difference was observed with the TAU + TAA group. In contrast, SIRT1 showed a reduction in mRNA expression in the TAA group when compared to the control ($P < 0.05$), TAU ($P < 0.05$), and TAU + TAA ($P < 0.01$) groups. The mRNA expression of TNF- α was increased in the TAA group compared to the control ($P < 0.05$) and TAU ($P < 0.05$) groups.

Discussion

NAFLD is a spectrum of disorders that range from asymptomatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis. Many factors are involved in the pathogenesis and progression of NAFLD, such as insulin resistance, oxidative stress,

and inflammatory cascade [22]. A two-hit theory has been accepted as the hypothesis for the chain of events that has been implicated in the progression of steatosis to NASH [23]. This theory postulates that steatosis, the first hit, increases the liver sensitivity to oxidative stress and to proinflammatory cytokines, which characterizes the second hit [24]. Recently, a third hit - hepatocyte death and lack of repair - was included to explain the NAFLD progression [25].

TAA is a selective and potent hepatotoxin widely used in research as an inducer of hepatic damage [26]. To exert its hepatotoxic effect, TAA needs to undergo two steps of bioactivation mediated by CYP2E1. The metabolites of TAA then form covalent bonds with liver macromolecules [27]. Moreover, the oxidative stress seems to have an important role in TAA-induced liver injury [28]. In humans, greater than 5% accumulation of lipids in hepatocytes is characterized as NAFLD. However, in Zebrafish, there is no cutoff percentage for this disease. Because of this, we considered the group with a significant difference in hepatic lipid content compared to control group as the definition of hepatic steatosis. The results of this study showed that TAA treatment of Zebrafish induced hepatic steatosis in Zebrafish similar to that previously described [12].

Hepatic triglyceride formation is a protective strategy for the liver to defend itself from lipotoxicity caused by an overload of FFA from adipose tissue [29, 30]. These FFA also undergo β -oxidation or become esterified with glycerol to form triglycerides, which are then packaged and exported as very low density lipoprotein (VLDL). Therefore, hepatic fat accumulation can occur as a result of fat synthesis or increase in delivery, reduction of fat oxidation, or decrease in fat exportation [31]. Nevertheless, hypertriglyceridemia is an independent risk factor associated with NAFLD [32]. Contrary to our expectations, this study did not find a significant

difference in serum triglycerides between the groups. However, TAA-treated Zebrafish that received taurine showed an improvement in fat lipid accumulation compared to TAA-treated Zebrafish alone. This result is in agreement with others studies that observed a reduction in hepatic steatosis after treatment with taurine in models of hepatic injury [9, 33, 34].

Several studies have demonstrated the antioxidant role of taurine [35, 36]. In this study, we found an increase of lipoperoxidation in the group exposed to TAA and a protective effect of taurine on lipoperoxide formation in Zebrafish. We have not found any study to date that has analyzed the effect of taurine on oxidative stress in the Zebrafish liver. Taurine has been previously evaluated in the Zebrafish brain exposed to ethanol and was shown to prevent the increase of lipid peroxidation induced by ethanol [37]. Our finding is consistent with previous studies in rats, which also observed a higher content of malondialdehydes in the TAA-induced hepatic damage group as well as a reduction of hepatic lipoperoxidation when taurine was co-administered with TAA [8, 28]. Considering that taurine is a very stable molecule, it may have a scavenger-type role against reactive oxygen species (ROS). In fact, it has been demonstrated that taurine inhibits lipoperoxidation induced by tert-butyl hydroperoxide in slices of rat liver and can protect thiol groups from oxidation [38].

SOD and CAT act coordinately to control ROS levels. SOD catalyzes the reaction of two superoxide anions, resulting in the formation of hydrogen peroxide, which is less reactive and can be degraded by enzymes such as CAT. Our results indicated a decrease in SOD activity in the group with TAA-induced liver damage compared to the control; however, there were no changes in CAT activity. It is well known that an imbalance in antioxidant defenses promotes lipoperoxidation and oxidative stress, which is an important factor in the progression of NAFLD and some studies have

reported a reduction of SOD activity in the liver of patients with NAFLD [39-41]. On the other hand, the TAU + TAA group presented higher levels of SOD activity compared to the TAA group. This result differs from some previous studies that have shown that SOD activity was not altered after taurine treatment, but this analysis was done in cirrhosis [8, 28]. In contrast, Chang et al. found an enhancement of SOD activity in hamsters with steatosis induced by a high fat/cholesterol diet that were treated with taurine [42]. The increase in SOD activity and decrease in lipid peroxidation in the TAU + TAA group in our study confirms the hypothesis that taurine exerts a protective effect on the oxidant-antioxidant imbalance, thereby preventing oxidative stress.

Many genes are the focus of studies that attempt to elucidate the molecular mechanisms involved in NAFLD development and progression [43]. In this study, we found an enhancement in TNF- α and decrease in ADIPOR2 and SIRT1 mRNA expression in the TAA group compared to the Ctrl group. In fact, a reduction in TNF- α and ADIPOR2 levels has been observed in individuals with NAFLD [44, 45]. Adiponectin is an anti-inflammatory adipokine that is antagonized by TNF- α . Low circulating levels of adiponectin seems to contribute to the progression of NAFLD [44]. The adiponectin effects in the liver are predominantly mediated by the receptor ADIPOR2 and the mRNA expression of this receptor negatively correlates with hepatic aminotransferases in NAFLD patients [45]. Higher ADIPOR2 expression in the liver was shown in transgenic mice with moderate overexpression of SIRT1 [46]. In this study, we found an increase in SIRT1 expression in the TAU + TAA group compared to the TAA group alone.

SIRT1 is an NAD⁺-dependent protein deacetylase that has been recently associated with a protective effect in NAFLD [47]. No published study to date has evaluated the

effect of taurine on SIRT1 expression in hepatic steatosis in adult Zebrafish. The expression of SIRT1 is highest in the male gonads and liver compared to other tissues, and has the highest expression among other isoforms in Zebrafish [48]. Deng et al. found a reduction of SIRT1 expression in rats with NAFLD caused by high-fat diets [49]. In addition, Costa et al. found that SIRT1 expression was decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe steatosis compared to patients with slight or moderate steatosis [50]. Moreover, the function of SIRT1 in hepatic steatosis seems to be due to the induction of SOD and lower activation of TNF- α and interleukin 6 (IL-6), which confers a protective effect during the second hit of NASH [46].

In conclusion, the results of this study revealed that taurine can improve oxidative stress parameters in a model of hepatic steatosis induced by TAA in adult wild-type Zebrafish. Furthermore, we found that taurine prevented the decrease of SIRT1 mRNA expression caused by TAA exposure. Based on our results, taurine may be a promising therapy for treating hepatic steatosis.

Reference

1. Roberts, EA. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a "growing" problem? *J Hepatol* 2007; 46(6): 1133-42.
2. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1221-31.
3. Browning, JD, LS Szczepaniak, R Dobbins et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40(6): 1387-95.
4. Moretto, M, C Kupski, CC Mottin et al. Hepatic steatosis in patients undergoing bariatric surgery and its relationship to body mass index and co-morbidities. *Obes Surg* 2003; 13(4): 622-4.

5. Cotrim, HP, ER Parise, CP Oliveira et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol* 2011; 10(1): 33-7.
6. M. K, OH, W J, and P F. Review article: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2008; 28(5): 503-522.
7. Huxtable, RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992; 72(1): 101-63.
8. Balkan, J, S Dogru-Abbasoglu, O Kanbagli et al. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20(5): 251-4.
9. Chen, SW, YX Chen, J Shi et al. The restorative effect of taurine on experimental nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51(12): 2225-34.
10. Lam, SH and Z Gong. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle* 2006; 5(6): 573-7.
11. Passeri, MJ, A Cinaroglu, C Gao et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 2009; 49(2): 443-52.
12. Rekha, RD, AA Amali, GM Her et al. Thioacetamide accelerates steatohepatitis, cirrhosis and HCC by expressing HCV core protein in transgenic zebrafish *Danio rerio*. *Toxicology* 2008; 243(1-2): 11-22.
13. Amali, AA, RD Rekha, CJ Lin et al. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci* 2006; 13(2): 225-32.
14. McGrath, P and CQ Li. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov Today* 2008; 13(9-10): 394-401.
15. Kinkel, AD, ME Fernyhough, DL Helterline et al. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology* 2004; 46(1): 49-56.
16. Jagadeeswaran, P, JP Sheehan, FE Craig et al. Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *Br J Haematol* 1999; 107(4): 731-8.
17. Buege, JA and SD Aust. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
18. Misra, HP and I Fridovich. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-5.

19. Boveris, A and B Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134(3): 707-16.
20. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
21. Livak, KJ and TD Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
22. Lewis, J and S Mohanty. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Digestive Diseases and Sciences* 2010; 55(3): 560-578.
23. Day, CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16(5): 663-78.
24. Day, CP and OF James. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114(4): 842-5.
25. Tiniakos, DG, MB Vos, and EM Brunt. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 145-71.
26. Chilakapati, J, K Shankar, MC Korrapati et al. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. *Drug Metabolism and Disposition* 2005; 33(12): 1877-1885.
27. Tunez, I, MC Munoz, MA Villavicencio et al. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. *Pharmacol Res* 2005; 52(3): 223-8.
28. Dogru-Abbasoglu, S, O Kanbagli, J Balkan et al. The protective effect of taurine against thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20(1): 23-7.
29. Law, K and EM Brunt. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2010; 14(4): 591-604.
30. Yamaguchi, K, L Yang, S McCall et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45(6): 1366-74.
31. Dowman, JK, JW Tomlinson, and PN Newsome. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Qjm*; 103(2): 71-83.
32. Assy, N, K Kaita, D Mymin et al. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 2000; 45(10): 1929-34.

33. Tasci, I, N Mas, MR Mas et al. Ultrastructural changes in hepatocytes after taurine treatment in CCl₄ induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2008; 14(31): 4897-902.
34. Chen, X, BM Sebastian, H Tang et al. Taurine supplementation prevents ethanol-induced decrease in serum adiponectin and reduces hepatic steatosis in rats. *Hepatology* 2009; 49(5): 1554-62.
35. Schaffer, SW, J Azuma, and M Mozaffari. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87(2): 91-9.
36. Lakshmi Devi, S and CV Anuradha. Mitochondrial damage, cytotoxicity and apoptosis in iron-potentiated alcoholic liver fibrosis: amelioration by taurine. *Amino Acids* 2010; 38(3): 869-79.
37. Rosemberg, DB, RF da Rocha, EP Rico et al. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 2010; 171(3): 683-92.
38. Oliveira, MW, JB Minotto, MR de Oliveira et al. Scavenging and antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. *Pharmacol Rep* 2010; 62(1): 185-93.
39. Oliveira, CP, AM Coelho, HV Barbeiro et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39(2): 189-94.
40. Videla, LA, R Rodrigo, M Orellana et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106(3): 261-8.
41. Yesilova, Z, H Yaman, C Oktenli et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(4): 850-5.
42. Chang, YY, CH Chou, CH Chiu et al. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit. *J Agric Food Chem* 2011; 59(1): 450-7.
43. Malaguarnera, M, M Di Rosa, F Nicoletti et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med* 2009; 87(7): 679-95.
44. Jou, J, SS Choi, and AM Diehl. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28(4): 370-9.

45. Kaser, S, A Moschen, A Cayon et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54(1): 117-21.
46. Banks, AS, N Kon, C Knight et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008; 8(4): 333-41.
47. Colak, Y, O Ozturk, E Senates et al. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit* 2011; 17(5): HY5-9.
48. Pereira, TCB, EP Rico, DB Rosemberg et al. Zebrafish as a Model Organism to Evaluate Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression. *Zebrafish* 2011; 8(1): 9-16.
49. Deng, XQ, LL Chen, and NX Li. The expression of SIRT1 in nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet in rats. *Liver Int* 2007; 27(5): 708-15.
50. Costa Cdos, S, TO Hammes, F Rohden et al. SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. *Obes Surg* 2010; 20(5): 633-9.

Figure Legends

Figure 1. Histological appearance of liver sections from the four experimental groups (1000 ×). The first column (**A,C,E,G**) was staining with hematoxylin and eosin and the second column (**B,D,F,H**) was stained with Oil Red O. (**A,B**) Control group. (**C,D**) Taurine group. (**E,F**) Thioacetamide group. (**G,H**) Taurine-thioacetamide group.

Figure 2. The effect of taurine and thioacetamide on the hepatic accumulation of lipids (**A**) and serum triglycerides (**B**). To test differences between groups, ANOVA followed by the Tukey test were used ($P < 0.05$). Data are presented as mean and standard error. ^a Difference between control (Ctrl) and thioacetamide (TAA) group. ^b Difference between the TAA group and the co-treatment of taurine and thioacetamide (TAU + TAA) group.

Figure 3. The effect of taurine and thioacetamide on hepatic lipoperoxidation (**A**), SOD (**B**), and CAT (**C**) activity. To test differences between groups, ANOVA followed by the Tukey test were used ($P < 0.05$). Data are presented as mean and standard error. ^aDifference between the control (Ctrl) and thioacetamide (TAA) group. ^b Difference between the TAA group and the co-treatment of taurine and thioacetamide (TAU + TAA) group.

Figure 4 – The effect of taurine and thioacetamide on the mRNA expression of ADIPOR2 (**A**), SIRT1 (**B**), and TNF- α (**C**). To test differences between groups, the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test were used ($P < 0.05$). Each box represents the median and interquartile range of values, with the ends of the vertical lines indicating the minimum and maximum data values. ^a Difference between the

control (Ctrl) and thioacetamide (TAA) group. ^bDifference between the TAA group and the co-treatment of taurine and thioacetamide (TAU + TAA) group.

Figure 1

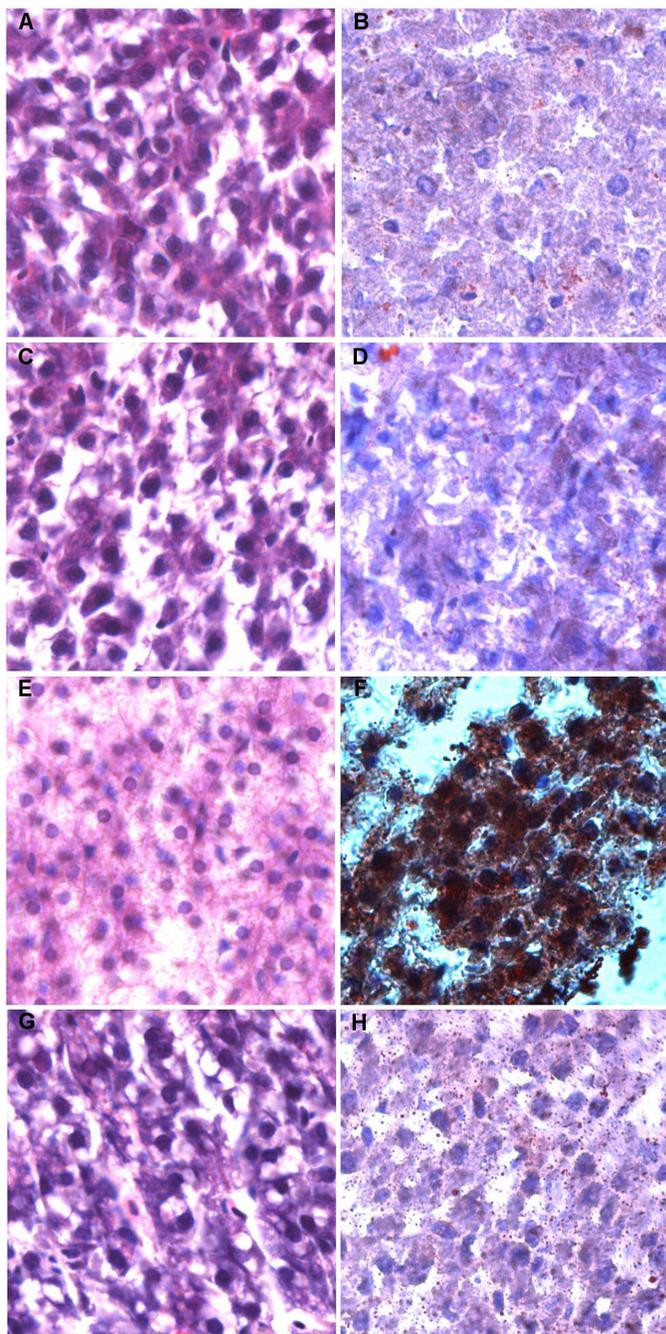


Figure 2

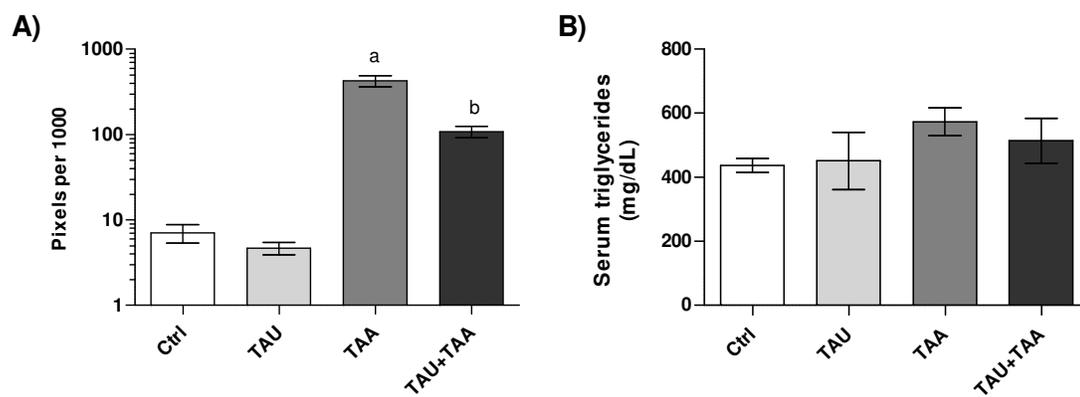


Figure 3

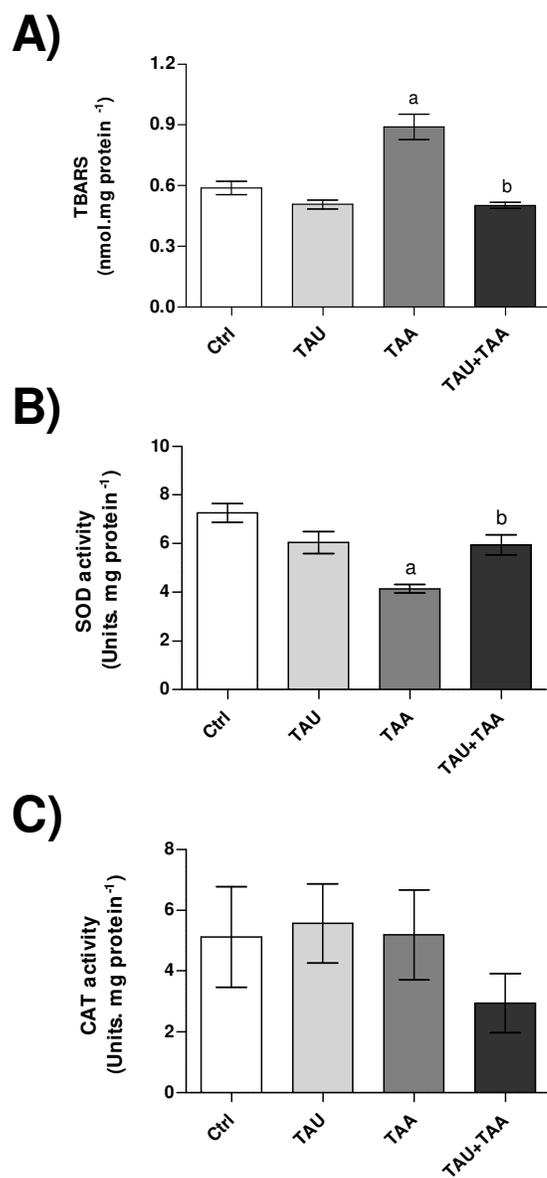


Figure 4

