



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**AYANE ARAÚJO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E TECIDUAIS HEPÁTICOS  
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIETA HIPERCALÓRICA: UMA FORMA  
DE ESTUDAR COMORBIDADES NO FÍGADO**

**PARNAÍBA – PI  
2018**

AYANE ARAÚJO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E TECIDUAIS HEPÁTICOS  
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIETA HIPERCALÓRICA: UMA FORMA  
DE ESTUDAR COMORBIDADES NO FÍGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos.

Orientador: Professor Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

AYANE ARAÚJO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E TECIDUAIS HEPÁTICOS  
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIETA HIPERCALÓRICA: UMA FORMA  
DE ESTUDAR COMORBIDADES NO FÍGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos  
Universidade Federal do Piauí

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Joílson Ramos de Jesus  
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. YURI DIAS MACEDO CAMPELO  
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba

---

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos  
Universidade Federal do Piauí  
(Orientador)

PARNAÍBA – PI  
2018

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Francisca Marlúcia Araújo Rodrigues e Raimundo Muniz Rodrigues Filho, meus irmãos Cicero Araújo Rodrigues, Lennon Araújo Rodrigues, e aos meus três grandes amores José Osmar Carneiro Alves, Ana Lara Rodrigues Alves e Lia Maria Rodrigues Alves meus melhores e maiores presentes.

*“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”*  
(Antoine de Saint- Exupéry)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por ter me dado força e coragem durante toda esta caminhada.

Aos meus pais Raimundo Muniz e Francisca Marlúcia, pelo amor, carinho, paciência, ensinamentos e por depositarem toda confiança em mim e não medirem esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar, sempre com muito amor e zelo no decorrer dessa trajetória e em toda minha vida.

Ao meu esposo José Osmar e minhas filhas Ana Lara e Lia Maria, amores incondicionais da minha vida.

Ao meu orientador Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, pela constante ajuda e orientação neste trabalho, e contribuição fundamental na minha formação.

Aos meus amigos do mestrado, pela amizade e colaboração mútua durante as pesquisas.

À Universidade Federal do Piauí e seus professores, por todo suporte dado durante a graduação e mestrado.

E, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram nesses processo de transformação profissional.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Imagem Ilustrativa do fígado</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2. Tecido hepático</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3. Imagem ilustrativa da história natural da DHGNA</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4. Tecido hepático com esteatose</b>	<b>26</b>
<b>Figura 5. Níveis de MDA no tecido hepático</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Níveis de MPO no tecido hepático</b>	<b>38</b>
<b>Figura 7. Níveis de GSH no tecido hepático</b>	<b>39</b>
<b>Figura 8. Avaliação histopatológica do tecido hepático</b>	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Kits imunoenzimático para marcadores sorológicos</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 2. Peso corporal e peso hepático</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 3. Dosagens bioquímicas do soro</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 4. Avaliação histopatológica do fígado</b>	<b>40</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL- Ácido graxos livres**
- ALB – Albumina**
- ALT- Alanina aminotransferase**
- AST- Aspartato aminotransferase**
- AU - Ácido úrico**
- CREA – Creatinina**
- CONCEA - Conselho nacional de experimentação animal**
- CT- Colesterol total**
- DECS - Descritores em ciências da saúde**
- DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica**
- DHC - Dieta hipercalórica**
- DM2 - Diabetes mellitus tipo 2**
- EROs - Espécies reativas ao oxigênio**
- EHNA - Esteato-hepatite não alcoólica**
- FAL- Fosfatase alcalina**
- GSH - Glutationa reduzida**
- HDL- Lipoproteína de alta densidade**
- HE - Hematoxilina / eosina**
- HP - Hapatócitos**
- HTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio**
- EJ - Epitélio juncional**
- LAPHIS - Laboratório de análise e processamento histológico**
- LDL- Lipoproteína de baixa densidade**
- MCD - Dieta deficiente em metionina e colina**
- MDA – Malondialdeído**
- MPO – Mieloperoxidase**
- PAS - Ácido periódico de shciff**
- PT- Proteínas totais**
- SM - Síndrome metabólica**
- SN – Sinusóide**
- TBA - Ácido tiobarbitúrico**

**TC - Tecido conjuntivo**

**TG – Triglicerídeos**

**TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa**

**VC - Veia central**

**VLDL - Lipoproteína de muita baixa densidade**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 CAPÍTULO I</b>	<b>19</b>
<b>2.1 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1 Características gerais do fígado</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Metabolismo do fígado</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)</b>	<b>23</b>
2.1.3.1 História natural da DHGNA	24
2.1.3.2 Alterações histológicas da DHGNA	25
2.1.3.3 Epidemiologia da DHGNA	27
2.1.3.4 Fisiopatologia da DHGNA e implicações nutricionais	28
<b>2.1.4 Modelos de dieta</b>	<b>31</b>
<b>2.2 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
2.2.1 Objetivo geral	32
2.2.2 Objetivo específico	32
<b>2.3 MATERIAS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>2.3.1 Tipo de estudo e aspectos éticos da pesquisa</b>	<b>33</b>
<b>2.3.2 Animais</b>	<b>33</b>
<b>2.3.3 Delineamento experimental</b>	<b>33</b>
<b>2.3.4 Eutanásia</b>	<b>33</b>
<b>2.3.5 Avaliação histopatológica do fígado</b>	<b>34</b>
<b>2.3.6 Dosagens</b>	<b>35</b>
2.3.6.1 Níveis de malondialdeído (MDA)	35
2.3.6.2 Níveis de mieloperoxidase (MPO)	35
2.3.6.3 Níveis de glutatona (GSH)	35
2.2.6.4 Dosagens bioquímicas do soro	36
<b>2.3.7 Análise estatística</b>	<b>37</b>
<b>2.4 RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>2.5 DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>2.6 CONCLUSÃO</b>	<b>47</b>

<b>3 CAPÍTULO II</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Artigo de revisão</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO A – Parecer do comitê de ética animal</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO B – Carta de aceite da revista</b>	<b>82</b>



## RESUMO

A composição de macronutrientes da dieta, particularmente o alto consumo independente de carboidrato dietético, açúcares simples, gorduras, proteínas e a baixa ingestão de fibra podem estar associados ao risco de desenvolver doenças hepáticas como a Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Os modelos de dieta em animais permitem que os pesquisadores controlem fatores genéticos e ambientais que possam influenciar o desenvolvimento da doença e suas complicações secundárias, ganhando assim informações úteis sobre seu manejo e tratamento. Sabe-se que a ingestão total de calorias altas está associada à DHGNA e esteato-hepatite não alcoólica, e vários estudos têm sido focados no papel de nutrientes específicos, como gorduras saturadas e carboidratos, no desenvolvimento e transição da doença. O objetivo deste estudo é avaliar as alterações metabólicas e teciduais hepáticas em um novo modelo experimental de dieta hipercalórica. Foram utilizadas 16 ratas divididas em dois grupos: grupo dieta padrão e grupo dieta hipercalórica, com 8 animais cada. As ratas foram submetidas à análise dos seguintes parâmetros no tecido hepático: dosagem dos níveis de malondialdeído (MDA), glutathiona (GSH), e a atividade de mieloperoxidase (MPO). As amostras de fígado também foram sujeitas à avaliação histopatológica. Por fim, foram dosados os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FAL), ácido urico (AU) e colesterol total (CT), cálcio (Ca), ureia e HDL. Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa no MDA, GSH, colesterol total (CT), ALT, ALB, AU, cálcio (Ca) e HDL. A avaliação histopatológica apresentou um escore baixo, insuficiente para a classificação da DHGNA. Em conclusão, foi possível observar que os danos hepáticos decorrentes da dieta hipercalórica experimental em ratos não apresentam extensão e severidade associados com a DHGNA. Em virtude disso, ressalta-se que esse modelo permite estudar a associação entre a Dieta hipercalórica (DHC) com outras comorbidades.

**Palavras-chave:** Fígado gordo, modelos animais, comorbidades, dieta, DHGNA.

## ABSTRACT

The macronutrient composition of the diet, particularly high intakes of dietary carbohydrate, simple sugars, fats, proteins and low fiber intake may be associated with the risk of developing liver diseases such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Animal diet models allow researchers to control genetic and environmental factors that may influence the development of the disease and its secondary complications, thus gaining useful information about its management and treatment. It is known that the total intake of high calories is associated with NAFLD and non-alcoholic steatohepatitis, and several studies have focused on the role of specific nutrients, such as saturated fats and carbohydrates, in the development and transition of the disease. The objective of this study is to evaluate metabolic and hepatic tissue changes in a new experimental model of hypercaloric diet. Sixteen rats were divided into two groups: the standard diet group and the hypercaloric diet group, with 8 animals each. The rats were submitted to analysis of the following parameters in hepatic tissue: dosage of malondialdehyde (MDA) levels, glutathione (GSH), and myeloperoxidase activity (MPO). Liver samples were also subjected to histopathological evaluation. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin (ALB), alkaline phosphatase (FAL), uric acid and total cholesterol (TC), calcium (CA), urea and HDL. The results showed that there was a significant difference in MDA, GSH, total cholesterol (CT), ALT, ALB, AU, calcium (CA) and HDL. The histopathological evaluation presented a low score, insufficient for the classification of NAFLD. In conclusion, it was possible to observe that hepatic damages resulting from the experimental hypercaloric diet in rats did not present the extension and severity associated with NAFLD. As a result of this, it is emphasized that this model allows to study the association between the Hypercaloric Diet (DHC) and other comorbidities.

**Keywords:** Fatty liver, animal models, comorbidities, diet, NAFLD

## 1 INTRODUÇÃO

Os modelos de dieta em animais permitem que os pesquisadores controlem, *in vivo*, fatores genéticos e ambientais que possam influenciar o desenvolvimento da doença e suas complicações secundárias, ganhando assim informações úteis sobre seu manejo e tratamento (LOZANO et al., 2016). Vários estudos têm focado no papel de nutrientes específicos, como gorduras saturadas e carboidratos, no desenvolvimento e transição da DHGNA (TOSHIMITSU et al., 2007; TETRI et al., 2008). Parry e Hodson (2017) analisaram os estudos observacionais e de intervenção disponíveis que investigaram a influência de macronutrientes dietéticos no teor de gordura hepática e concluíram que o consumo de uma dieta hipercalórica aumentou o teor de gordura do fígado e, inversamente, o consumo de uma dieta hipocalórica diminuiu o teor de gordura hepática.

O consumo de dietas hipercalóricas levam a um estado obesogênico, aumentando o risco de desenvolver doenças associadas a distúrbios metabólicos, como a síndrome metabólica (SM) (AUBERVAL et al., 2014). A SM tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo e é definido por uma combinação de várias anormalidades metabólicas: tolerância à glicose prejudicada ou resistência à insulina, alteração da pressão arterial, dislipidemia, alterações cardiovasculares e obesidade central (CAMERON et al, 2007; GHEZZI et al, 2012).

A resistência à insulina e a acumulação excessiva de lipídios estão fortemente associadas à Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que representa a manifestação hepática de uma deficiência sistêmica da rede de insulina (BUGIANESI et al., 2010). Esta patogênese é multifatorial e inclui alterações no metabolismo lipídico, com acumulação aberrante de triglicerídeos, disfunção mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo. Como resultado do estresse oxidativo, há uma propagação de espécies reativas de oxigênio, produzidas por peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e a redução de moléculas antioxidantes como a glutatona (GSH) (TAKAKI et al., 2013). Segundo Tannaz, puneeta e Maitreyi (2017) a composição de macronutrientes da dieta, o alto consumo de carboidrato dietético, açúcares simples, gorduras, proteínas e a baixa ingestão de fibra pode estar associada ao risco de desenvolver doenças hepáticas como a DHGNA.

A DHGNA é a doença hepática crônica mais comum no mundo industrializado e se tornará um dos desafios mais importantes para a saúde



pública nas próximas décadas por suas complicações hepáticas e extra-hepáticas (DELLA et al., 2017). Esta patologia apresenta um espectro de doenças hepáticas variando de esteatose simples a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), que é determinada pela presença de esteatose hepática e inflamação, associada com a morte de hepatócitos; muitos pacientes evoluem para fibrose / cirrose e insuficiência hepática (DOU et al., 2018). A DHGNA é diagnosticada histologicamente quando ocorre acumulação de lipídio em > 5% de hepatócitos (TANDRA et al., 2011; CHALASANI et al., 2012).

O reconhecimento do potencial evolutivo da DHGNA e a sua alta prevalência na população mundial, são os principais motivos que despertam o interesse dos pesquisadores para realizar estudos relacionados a essa patologia. O aumento do reconhecimento da doença e os esforços adicionais para elucidar sua patogênese levaram a uma elevação no uso dos modelos animais de DHGNA nos últimos anos (LAU; ZHANG, 2017; IBRAHIM et al., 2016). Os modelos de animais contribuíram bastante para o estudo da DHGNA. No entanto, deve-se notar que o tempo de início e grau de ambas as características metabólicas e DHGNA é dependente de espécies, estirpe, sexo e composição da microbiota intestinal, bem como o teor de gordura na dieta (HERCK, VONGHIA, FRANQUE, 2017).

Kakimoto, Kowaltowski (2016) relatam que a composição dietética e as implementações de protocolos nos modelos de animais variam amplamente, assim como os resultados das intervenções dietéticas. Lau e Zhang (2017) descreve os modelos animais atuais e mais utilizados para cada estágio de DHGNA. Segundo eles os modelos são de dieta rica em gordura, de dieta deficiente em metionina e colina, de dieta com alto teor de colesterol, de dieta rica em gordura de colina, de dieta por L-aminoácido com deficiência de colina, de dieta deficiente em colina de L-aminoácido associado a tetracloreto de carbono e de dieta com alto teor de gordura associado a estreptozotocina.

Esses modelos tentam imitar os distúrbios metabólicos observados na doença, bem como as alterações histológicas hepáticas (GOOSSENS, N.; JORNAYVAZ, 2017). Os modelos de dieta são ferramentas úteis para estudar a patogênese e a progressão da DHGNA, e investigar possíveis alvos de tratamento, conforme indicado (LAU; ZHANG, 2017).

Na literatura só existem relatos de estudos demonstrando a utilização do modelo experimental de dieta como indutor de dano hepático, sem associação com outras comorbidades. Assim, Diante da correlação evidente entre dietas experimentais e indução de patologias, em especial as doenças hepáticas, o estudo foi direcionado a avaliar os parâmetros metabólicos e teciduais hepáticos em um modelo experimental de dieta hipercalórica e relacionar esse modelo como ferramenta para associação com outras comorbidades.

## 2 CAPÍTULO I

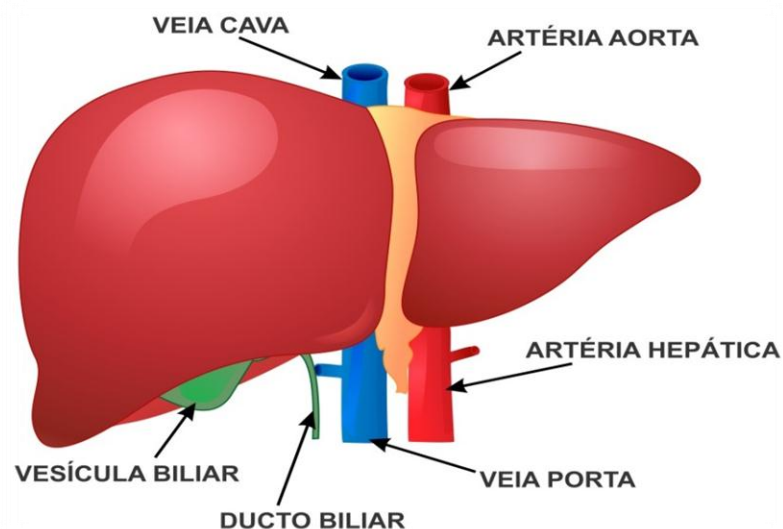
### 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1.1 Características Gerais do Fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, apresentando peso em torno de 1,5 kg (NEMETH et al., 2009). Em torno de 80% de seu volume é constituído pelos hepatócitos, sendo o restante do órgão composto de células não parênquimais, abrangendo células de Ito, células endoteliais, células de Kupfer e linfócitos (GAO et al., 2008). Este órgão é encarregado pela síntese de proteínas séricas, lipídeos e carboidratos, metabolismo de aminoácidos, secreção de bile e desintoxicação de compostos xenobióticos (DUNCAN et al., 2009).

O fígado possui quatro lobos pouco definidos (KIERSZENBAUM, 2004; EIPEL et al., 2010). Apresenta uma divisão em unidades funcionais, denominadas lóbulos, que são compostos por células conhecidas como hepatócitos. Os lóbulos são nutridos pelo sangue procedente das veias periféricas. Estas abrangem pequenas ramificações das artérias hepáticas e da veia portal. O sangue passa em canais chamados sinusoides, que são protegidos por macrófagos, as células de Kupffer (VIEIRA, 2014) (FIGURA 1).

**Figura 1.** Imagem ilustrativa do Fígado. Observa-se as veias cava e veia porta, artéria aorta e artéria hepática, ducto biliar e vesícula biliar.



Fonte: Próprio autor

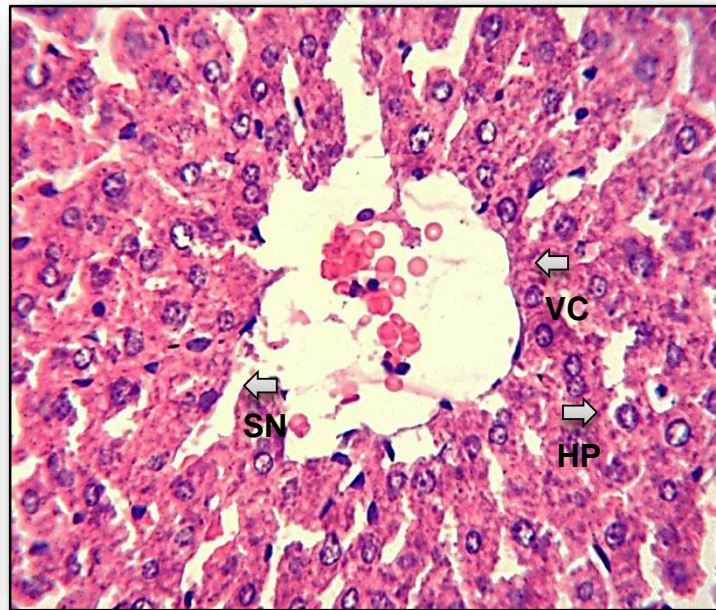
O sistema circulatório do fígado é diferente do observado em outros órgãos, pois recebe por intermédio da zona hilar um duplo fluxo sanguíneo, em torno 25% de sangue arterial rico em oxigênio é procedente da artéria hepática e 75% de sangue venoso rico em nutrientes procedentes da veia porta, que resulta da drenagem do estômago, baço, pâncreas e intestino (BOWEN, 2004). Esta característica possibilita ao fígado monitorar as substâncias que são absorvidas no intestino e apontar quais delas vão entrar e como vão entrar na circulação sistêmica. No parênquima hepático, o sangue arterial e venoso misturam-se quando penetram nos sinusoides, que são canais vasculares fenestrados restritos por células endoteliais, que se localizam entre os hepatócitos. Desta forma, os hepatócitos estão geralmente expostos ao sangue venoso portal, como também ao sangue arterial. Todo o sangue lançado ao fígado é apanhado por um único conjunto de veias, cujas veias centrais dos lóbulos hepáticos são os ramos iniciais da veia hepática. Estas acabam por formar a veia hepática que se abre na veia cava inferior, que transpassa o parênquima hepático e distribui os nutrientes do metabolismo hepático para todo o corpo (DYCE; SACK; WENSING, 2004; EROSCHENKO; FIORE, 2013).

As células estreladas ou lipócitos hepáticos, conhecidas por células do Ito, se encontram no espaço de Disse e acumulam lipídios e vitaminas lipossolúveis no organismo, a exemplo da vitamina A sob a forma de esteres de retinol. As células do Ito secretam fatores de crescimento essenciais ao desenvolvimento de novos hepatócitos. Quando a função hepática está debilitada, os hepatócitos liberam o fator de crescimento tumoral  $\beta$  e, como resposta, as células de estoque de gordura podem dividir-se, modificando o seu fenótipo, começando a sintetizar e a secretar colágeno para o espaço de Disse. Desta forma, origina-se o tecido conjuntivo fibroso que substitui os hepatócitos afetados pela ação de toxinas. Quando é preciso estas células diferenciam-se em miofibroblastos, que monitoram o fluxo de sangue para os sinusoides (DUARTE, 2014).

As células epiteliais chamadas de hepatócitos são morfologicamente uniformes, demonstrando uma forma poliédrica, núcleo central e em sua grande maioria possuindo apenas um único núcleo (DUARTE, 2014). Exibe uma organização em forma de cordões espessos que se anastomosam entre si gerando a unidade funcional do fígado, os lóbulos hepáticos (ALOIA, 2006) que se dispõem ao

redor da veia central (COELHO, 2011). Consiste em cerca de 80% da massa celular do fígado dos mamíferos (VU et al., 2017) ( FIGURA 2).

**Figura 2.** Tecido hepático. As setas indicam a presença da veia central (VC), sinusoides (SN) e hepatócitos (HP). Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), ampliação original X150.



Fonte: Próprio autor

O hepatócito possui dois lados, o basolateral, voltado para o espaço de Disse e está associado com a aspiração do conteúdo sanguíneo e secreção de proteínas plasmáticas; apical, formado por microvilosidades que compõem os canalículos onde é secretada a bile (COELHO, 2011). Essas microvilosidades ocupam grande parte do espaço de Disse proporcionando a troca de substâncias com a circulação sanguínea (DUARTE, 2014). Os hepatócitos contêm uma variedade de organelas devido a sua intensa metabolização. Os retículos endoplasmáticos são geralmente bem evidentes (ALOIA, 2006).

Danos produzidos aos hepatócitos provocam consequências que se manifestam, geralmente, como infiltrações de gordura (esteatose), inflamações

(hepatite) ou morte celular (necrose) (DOOLEY et al., 2011; NUNES, MOREIRA, 2007; REDDY, RAO, 2006).

### **2.1.2 Metabolismo do Fígado**

O fígado é o principal órgão metabólico do corpo humano e tem um papel importante na regulação do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (PARRY E HODSON, 2017). As ações metabólicas, executadas pelo fígado são relevantes para manutenção e funcionamento do corpo. Salientam-se entre elas o metabolismo dos lipídios, carboidratos e proteínas (DOUGLAS, 2002).

O metabolismo lipídico hepático é um processamento altamente estruturado, em que muitas vias são reguladas por receptores nucleares, fatores de transcrição e enzimas celulares (JUMP et al., 2005; IIZUKA, 2004). Esses fatores compõem sinais de várias vias e regulam a atividade da maquinaria metabólica necessária para conservar a homeostase dos lipídeos hepáticos (ZHENG et al., 2012; ZHENG et al., 2015).

O fígado possui uma função essencial no controle do metabolismo intermediário, pois é encarregado de aceitar e indicar o direcionamento das gorduras nele contido de acordo com as condições metabólicas e hormonais do indivíduo (SPASSIANI E KUK, 2008). O metabolismo lipídico é realizado no duodeno, pela ação da bile que tem como atividade emulsificar os lipídios, propiciando a quebra das moléculas de gordura, aumentando sua superfície de contato. Nesta circunstância, destaca-se a enzima lipase pancreática que age na quebra das moléculas grandes de gordura em ácidos graxos livres (AGL) (DOUGLAS, 2002).

A circulação dos lipídios no fígado é bidirecional, podendo estes ser secretados, receptados e oxidados pelo fígado (ZAMMIT, 1996). Além disso, as gorduras que chegam neste tecido podem ser acumuladas, oxidadas ou ainda canalizadas para secreção e utilização por tecidos periféricos tais como o músculo esquelético e o tecido adiposo por meio das lipoproteínas (GIBBONS, 1990). As lipoproteínas são estruturas esféricas formadas de apolipoproteínas, triacilglicerol, e esteres de colesterol (SHEPERD, 1992). O provimento de triacilglicerol a partir do fígado para os tecidos extra-hepáticos ocorre por meio da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (DURSTINE et al., 2002). Além da VLDL, o fígado é encarregado pela síntese da lipoproteína de baixa densidade (LDL), partícula rica

em colesterol e retrata uma fração remanescente de VLDL (DURSTINE E THOMPSON, 2001) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) cujo papel é realizar o transporte inverso de colesterol da periferia para o fígado (STEFANIK et al, 1998).

As proteínas são metabolizadas pelo fígado, uma vez que estas chegam ao órgão em forma de aminoácidos, e durante sua permanência no fígado podem ser excretadas para o músculo para que sejam acumuladas sob forma de energia ou transformadas em uréia para que sejam excretadas pela urina (LOUREIRO-SILVA MR; MOLINA; BORGES, 1999).

O fígado é órgão essencial na homeostase da glicose, reagindo rapidamente às alterações dos seus níveis sanguíneos, o que o torna indispensável para a manutenção de uma concentração normal de glicose no sangue. Os carboidratos são estocados pelo fígado na forma de glicogênio e são liberados em forma de glicose que será utilizada em todos os processos metabólicos (DUARTE, 2014). No estado prandial, o acúmulo de glicose no sangue é desviado para o fígado para ser estocado na forma de glicogênio e durante o jejum a glicose sanguínea apresenta níveis baixos, sendo equilibrado pelos hepatócitos que hidrolisam o glicogênio em glicose, processo chamado de glicogenólise. O excesso de glicogênio no fígado pela ingestão contínua de glúcidos leva à lipogênese (transformação em triglicerídeos) e estocagem nos tecidos. Os hepatócitos também podem produzir glicose de outros açúcares, como a frutose e a galactose, ou de compostos não peculiares ao grupo dos glúcidos, como os aminoácidos, o lactato e o glicerol, por um processo denominado neoglicogênese hepática, auxiliando dessa forma a conservar uma concentração relativamente normal de glicose no sangue, quando necessário (DUARTE, 2014)

Por ser o centro metabolizador do organismo, o fígado é alvo de inúmeras agressões metabólicas, tóxicas, circulatórias, microbianas e neoplásicas (CRAWFORD, 2000). Estas agressões podem gerar resultados hepáticos distintos, sejam elas reversíveis ou irreversíveis. Dentre as respostas hepáticas reversíveis pode-se citar a esteatose e fibrose que retirado o estímulo agressor faz com que o fígado volte a seu estado de normalidade. Dentre as alterações irreversíveis estão, principalmente, a fibrose (em grau mais avançado), cirrose e as neoplasias hepáticas (GUITIÉRREZ-RUIZ AND GÓMEZ-QUIROZ, 2007).

## 2.1.3 Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica

### 2.1.3.1 História natural da DHGNA

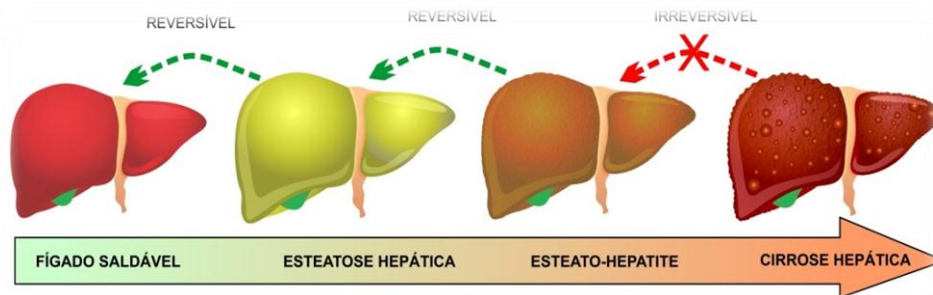
No presente, ainda encontra-se uma grande incerteza relacionada à história natural e prognóstico da DHGNA. Apesar da sua alta prevalência, somente uma minoria dos doentes progridem para um estado de fibrose significativo ou desenvolve morbidade associada (ANSTEE; DAY, 2013). Esta variação é, em parte, devida a modificações genéticas individuais sutis que alteram a resposta a fatores ambientais e estilo de vida e, desta maneira, mostram o fenótipo da doença (ANSTEE; DAY, 2013).

Os fatores de risco para a DHGNA podem ser divididos em “modificáveis” ou “comportamentais”, destacando-se alimentação inadequada, inatividade física, tabagismo, consumo de álcool e outras drogas. Em “não modificáveis”, a exemplo da herança genética, sexo, etnia e idade. Os fatores de risco comportamentais são otimizados pelos fatores socioeconômicos, ambientais e culturais (WHO, 2005; OPAS, 2007).

A DHGNA tem características histopatológicas similares às encontradas na hepatite alcoólica, em pacientes sem história de consumo significativo de álcool (< 20g de etanol/dia). O seu espectro integra desde a esteatose simples com armazenamento de gordura nos hepatócitos, à esteato-hepatite com componente necro-inflamatório com ou sem fibrose e cirrose, que pode progredir para o carcinoma hepatocelular. A esteato-hepatite tem elevado potencial de evoluir para sintomas mais graves da doença (SANTOS; COTRIM, 2006). A figura 03 apresenta esquematicamente a história natural da doença.

**Figura 3-** Imagem ilustrativa da História Natural da DHGNA. Pode-se observar que a evolução da DHGNA abrange fases que são características da esteatose hepática, esteato-hepatite e cirrose hepática.





Fonte: Próprio autor

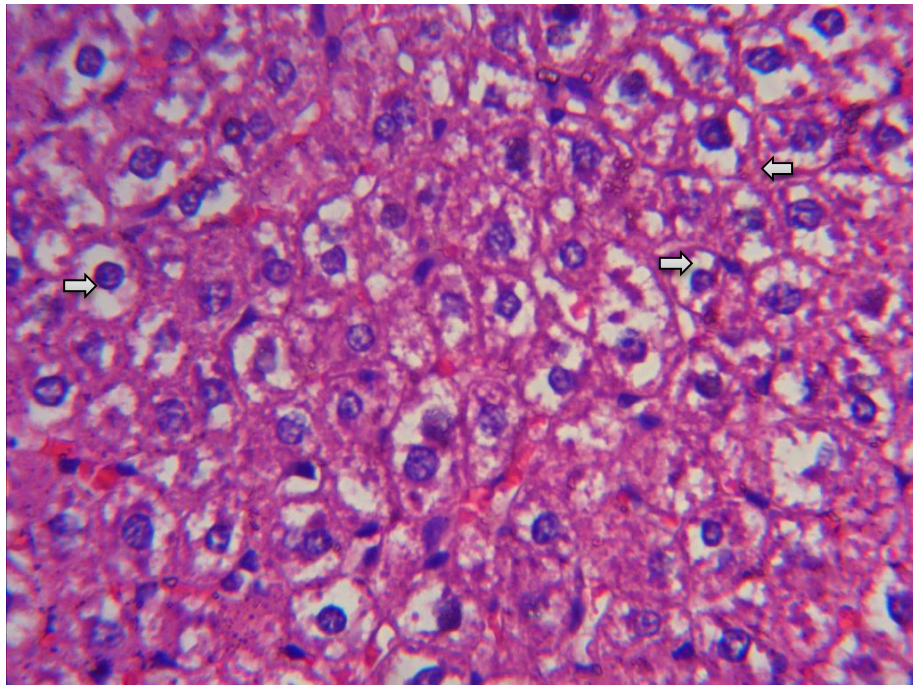
### 2.1.3.2 Alterações histológicas da DHGNA

Para Kobyljak e Abenavoli (2014) a DHGNA é uma patologia marcada histologicamente pela existência de certos sintomas no fígado, como balão celular, inflamação lobular, fibrose perinossoidal e perivenular, peculiaridades dificilmente distinguíveis identificadas em casos com doença hepática alcoólica.

- Esteatose: Na esteatose macrovesicular, os hepatócitos são reconhecidos pela existência de grandes vacúolos vazios, com núcleo transposto para a periferia da célula, e sinalizada fibrose pericelular da zona 3 (espaço de Disse), muitas vezes exibindo edema de hepatócitos (SHERLOCK e DOOLEY, 2002). Esse tipo de esteatose é a forma mais comum na DHGNA; quando não está seguida de outras modificações histológicas hepáticas, não resulta em avanço para formas mais graves da doença (MATTEONI, 1999). Já a microvesicular possui hepatócitos com estoque intracitoplasmático de pequenos vacúolos de lipídios (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001), núcleo central e nucléolos salientes, com pouca inflamação e necrose celular variante e leve, apesar de, ocasionalmente, poder existir grande necrose na zona 3. Este tipo de esteatose está relacionada ao dano da  $\beta$ -oxidação mitocondrial hepática de ácidos graxos (FROMENTY, BERSON, PESSAYRE; 1997) mas não é agente determinante do diagnóstico da DHGNA e retrata variações mais graves do metabolismo celular (FREITAS, COTRIM; 2006). Os dois tipos podem ocorrer ao mesmo tempo (SHERLOCK e DOOLEY, 2002) e divergem em seus mecanismos fisiopatológicos: a primeira tem como mecanismo básico a elevação na oferta de AGL ao fígado e a diminuição na movimentação desses compostos e, a segunda, resulta na redução da oxidação mitocondrial de AGL, provocando grave distúrbio no metabolismo oxidativo celular (GAYOTTO, VIANNA, LEITÃO; 2001).

Nos últimos tempos, o termo doença hepática gordurosa não alcoólica tem sido evocado cada vez mais em áreas de pesquisa e na prática clínica. Determina a existência de armazenamento significativo de gordura no fígado (> 5% de hepatócitos), na ausência de abuso de álcool e qualquer outra causa de doenças do fígado (NASCIMBENI et al., 2013).

**Figura 4.** Tecido hepático com esteatose. As setas indicam hepatócitos com conformação alterada e presença de esteatose microvesicular. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), ampliação original X150.



- Balonização hepatocelular: É uma alteração celular representada por hepatócitos distendidos, com forma globosa (em balão), com citoplasma vasto, claro e com aspecto de baixa densidade (BRUNT EM, TINIAKOS DG, 2010; FREITAS, ALVES; 2011). Demonstram modificações da permeabilidade da membrana, resultantes da atividade de radicais livres. Os hepatócitos em balão são considerados uma marca do diagnóstico da EHNA e têm papel fundamental na fisiopatologia da EHNA (KAKISAKA, 2018).

- Corpúsculos de Mallory: São inclusões citoplasmáticas hialinas, caracterizando-se como grânulos, cordões ou agregados fortemente eosinofílicos, compostos por

queratinas, proteínas de choque térmico, por proteínas comprometidas em processos de degradação e ocasionalmente proteínas inespecíficas adicionadas aos agregados (RILEY et al., 2003; STSNAD; STUMPTENER; ZATLOUKAL; DENK et al., 2008).

- Inflamação: Pode ser estimulada por inúmeros fatores como o estresse oxidativo (KOEK; LIEDORP; BAST, 2011) e a lipotoxicidade (lesão ou morte celular gerada pelos ácidos graxos livres e seus metabólitos). Estes ácidos graxos livres e seus metabólitos, como o diacilglicerídeo, o colesterol livre e a ceramida podem ser tóxicos para o hepatócito e, desta forma, começar o processo inflamatório (YAMAGUCHI et al., 2007; PALMA, 2012). Os adipócitos podem libertar citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), o que afeta na progressão da inflamação hepática (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993).

- Fibrose: É determinada pela abundância de tecido cicatricial em resposta à lesão hepática crônica (FRIEDMAN; ROLL; BOYLES; BISSELL, 1985), ou seja, é uma resposta de cicatrização reversível definida pelo acúmulo de matriz extracelular (MEC), principalmente de colágeno, pelas células estreladas hepáticas (HSC) acionadas após lesão hepática (HERNANDEZ; FRIEDMAN; 2011; FRIEDMAN, 2008). Como resultado final da fibrose progressiva, tem-se a cirrose. A fibrose avançada do fígado é uma questão distinta, porque o fígado cirrótico é a causa da insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (KAKISAKA, 2018).

### **2.1.3.3 Epidemiologia da DHGNA**

A DHGNA é a pandemia hepática do século XXI, sendo considerada uma das principais causas de doença hepática crônica no mundo Ocidental (BELLENTANI; SCAGLIONI; MARINO; BEDOGNI, 2010; MACHADO; CORTEZ-PINTO, 2013). A incidência da DHGNA e hiperlipidemia, com os seus riscos associados de estágio final de fígado e doenças cardiovasculares, está se elevando rapidamente (ZARZOUR et al., 2017). A população global é sensibilizada pela DHGNA com índices entre 25% a 30% com maior prevalência no Oriente Médio e América do Sul. Na América do Norte e na Europa, um quarto da população adulta tem

DHGNA (FAZEL et al., 2016). Porém, existe alteração de prevalência em função do gênero, idade, etnia e propriedades metabólicas (MASARONE et al., 2014). Quando a ultrassom foi aplicada como método de diagnóstico, a prevalência alterou entre 17% e 46%, dependendo da população estudada (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011). A verdadeira incidência e prevalência é difícil de determinar, até porque a maioria dos casos são assintomáticos (MATOS, 2017). A propagação mundial do diagnóstico da DHGNA está nitidamente associada às mudanças nos perfis dietéticos e na elevação do estilo de vida sedentário, não apenas nos países ocidentais, como também na área urbana dos países em desenvolvimento (MASARONE et al., 2014).

É relevante referir que a prevalência da DHGNA cresce nos doentes com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (70%) e obesidade mórbida (90%) (KHAN et al, 2015).

#### **2.1.3.4 Fisiopatologia da DHGNA e implicações nutricionais**

A fisiopatologia da DHGNA está intensamente associada com estilos de vida não saudáveis, que combinam sedentarismo, dietas hipercalóricas, excesso de gorduras saturadas, hidratos de carbono refinados, e alta ingestão de frutose como aditivo alimentar a vários produtos processados (GERBER; OTGONSUREN; MISHRA; ESCHEIK; BIRERDINC; STEPANOVA et al., 2012; BARRERA; GEORGE, 2014).

O mecanismo subjacente ao desenvolvimento e avanço da DHGNA é complexo e multifatorial. Na atualidade, a sua fisiopatologia é explicada pela teoria de “múltiplos hit” (RODRIGUES, 2014)

O “primeiro hit” desta teoria, é a resistência insulínica como requisito inicial para o armazenamento de ácidos graxos no hepatócito, resultando em lipogénese hepática de novo e numa restrição debilitada da lipólise no tecido adiposo. Por essa razão, o movimento de AGL para o fígado se eleva (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

Uma vez determinada a esteatose hepática, o fígado fica vulnerável ao “segundo hit”, isto é, o estress oxidativo. Mais precisamente, observa-se uma estocagem de gordura no fígado sob a forma de triglicerídeos, que ocorre simultaneamente com um aumento da lipotoxicidade (devido a níveis elevados de AGL, colesterol livre e outros metabolitos lipídicos). Como resultado, verifica-se uma

disfunção mitocondrial com estresse oxidativo, isto é, no processo de oxidação de AGL, nestes organelos, há uma propagação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs liberadas, além de participarem no processo de recrutamento de células, agredem os AGL, dando início ao processo de peroxidação lipídica nas células. Como subproduto desse processo, temos vários aldeídos, dentre eles o malondialdeído (MDA), que se forma apenas através da peroxidação dos AGL, os quais são oxidados a fim de diminuir a resistência de suas ligações carbono-hidrogênio (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

A liberação de citocinas como resultado da ação bacteriana e suas endotoxinas e também através da estimulação dos adipócitos acarreta a migração de células inflamatórias que participam na liberação de enzimas como a mieloperoxidase (MPO). A MPO forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana devido à sua reação com o peróxido de hidrogênio (LEITE et al., 2011). Este intenso estresse oxidativo, por sua vez, traz como consequência a diminuição de antioxidantes naturais, como a glutathiona (GSH) que possui sua maior concentração no tecido hepático em comparação com outros tecidos. A diminuição de GSH contribui para a manutenção e a progressão da esteatose (CHEN et al., 2007).

O “terceiro hit” trata dos fatores genéticos. Por último, a modificação da flora intestinal leva também à formação de ácidos graxos no intestino e a um aumento da permeabilidade do intestino delgado (KHAN et al, 2015). Desta forma, o fígado esteatótico ficaria vulnerável aos “hits”, gerando a lesão hepatocelular, à inflamação e à fibrose (DAY; JAMES, 1998; MARCHESINI et al., 2003).

A DHGNA começa quando há elevação dos triglicerídeos intracelular causado pelo desequilíbrio entre degradação e síntese de triglicerídeos. Entretanto, diversos são os indícios de que a obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo II podem induzir para este desequilíbrio e gerar a lipólise nos tecidos, ocasionando como resposta o acúmulo progressivo de lipídios nos hepatócitos (SILVA; ESCANHOELA, 2009). A aglomeração de lipídios pode chegar a níveis tóxicos, causando um aumento no estresse oxidativo, criação de radicais livres e lesão mitocondrial. A peroxidação lipídica anormal pode provocar danos hepáticos com inflamação e até mesmo a fibrose (SOLER; SILVA; SILVA; TEIXEIRA, 2008).

Estudos sobre mecanismos genéticos e moleculares propensos a DHGNA evidenciam o papel de variantes que elevam o estresse oxidativo, perfil pró-inflamatório de citocinas circulantes e anormalidades no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos (ANSTEE, 2013; SEVERSON, BESUR; BONKOVSKY, 2016).

Segundo Abenavoli (2016) a resistência à insulina, a massa gorda visceral, a dislipidemia, a obesidade, o diabetes e a síndrome metabólica são fatores de risco bem conhecidos em grande parte ligados à DHGNA. A resistência insulínica, considerável fator de risco para a DHGNA, pode causar a esteatose por meio da hiperinsulinemia, desequilíbrio na produção de citocinas, aumento de ácidos graxos livres na circulação (provenientes da lipólise do tecido adiposo) dentre outros. A elevação da captação destes ácidos graxos pelo hepatócito gera uma sobrecarga na  $\beta$ -oxidação mitocondrial, aglomerando ácidos graxos nos hepatócitos e elevando a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (ANDERSON, BORLAK, 2008; CUSI, 2009; ORTIZ, 2011) provocando injúria celular e ativação dos mecanismos de fibrose. A resistência insulínica também impede a exportação de triglicerídeos do hepatócito por degradar e bloquear a produção de VLDL (NAGLE; KLETT; COLEMAN, 2009; OLIVEIRA CP, MAZO DFC, 2013).

A ingestão dietética desempenha um papel muito importante na patogênese NAFLD. Apesar dos resultados contraditórios em relação ao papel das diferentes dietas na DHGNA, é razoável propor que o consumo excessivo de gordura ou carboidratos seja uma ameaça importante que pode promover o desenvolvimento da DHGNA (ASRIH, M., & JORNAYVAZ, FR., 2014). MCCARTHY EM & RINELLA ME (2012) relata que dados em animais e estudos observacionais sugerem que uma dieta rica em carboidratos piora a lesão hepática relacionada à DHGNA.

A doença hepática gordurosa não alcóolica, que é um termo geral para distúrbios hepáticos causados pela acumulação de triglicerídeos nos hepatócitos, é cada vez mais prevalente e tornou-se a doença hepática mais comum relacionada à supernutrição (FUJISAWA, K. et al., 2018).

#### **2.1.3.5 Modelos de dieta**

Muitos estudos utilizam a dieta rica em gordura para reproduzir patologias em modelos experimentais, como a doença hepática gordurosa não alcóolica, que inclui da esteatose até esteatohepatite (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014; EASL, 2016;

LOZANO et al, 2016, LAU; ZHANG, 2017; TANNAZ, PUNEETA E MAITREYI (2017), ASGHARI et al, 2017; o diabetes (LOZANO et al, 2016), a obesidade (ZENG, 2015; KAKIMOTO e KOWALTOWSKI, A.J 2016), doenças cardiovasculares (ZENG, 2015), a Síndrome metabólica (AUBERVAL et al, 2014), doenças renais (SHIRALI, A.C.; GOLDSTEIN, D.R., 2008; MIN, 2014) e intestinais (ROSAS-VILLEGAS, 2017).

O modelo clássico de DHC usa ratos alimentados com uma dieta composta por 71% de gordura, 11% de carboidratos e 18% de proteína por 3 semanas, em comparação com ratos de controle alimentados com uma dieta padrão de Lieber-DeCarli (2004) de 35% de gordura, 47% de carboidratos e 18% de proteína. Já o modelo dieta deficiente em metionina e colina consiste em 40% de sacarose e 10% de gordura; no entanto, é deficiente em metionina e colina. Outros modelos são o de dieta com alto teor de colesterol em que aproximadamente 1% da ingestão calórica total dos animais é de colesterol; enquanto que o de dieta rica em gordura de colina usa 20% de proteína, 35% de carboidrato e 45% de gordura, sem colina adicionada (LAU; ZHANG, 2017).

O aumento do reconhecimento da doença e os esforços adicionais para elucidar a patogênese DHGNA levaram a um aumento do número de modelos animais nos últimos anos (LAU, ZHANG, YU, 2016; IBRAHIM et al., 2016).

Para aprofundar a temática do estudo buscou-se realizar uma revisão sistemática da literatura a fim de responder o seguinte questionamento: Quais as produções científicas que discutem a relação entre a dieta e o surgimento da DHGNA em modelos de animais? A revisão está detalhada no capítulo II.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo geral**

Avaliar os parâmetros metabólicos e teciduais hepáticos em um modelo experimental de dieta hipercalórica.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

- Mensurar os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no fígado dos animais (MPO, MDA e GSH);
- Determinar os níveis séricos dos marcadores bioquímicos AST e ALT de lesão hepática nas amostras de soro dos animais;
- Analisar as dosagens bioquímicas de ácido úrico, albumina, fosfatase alcalina, colesterol total e cálcio presentes nas amostras de soro dos animais;
- Realizar a avaliação histopatológica das amostras de fígado;
- Avaliar a presença de DHGNA.



## **2.3 MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.3.1 Tipo de estudo e aspectos éticos da pesquisa**

O estudo foi delineado como uma pesquisa experimental, caracterizado como descritivo-analítico, sendo esta pesquisa sobre a avaliação das alterações metabólicas e teciduais hepática em um novo modelo experimental de dieta hipercalórica. O método experimental consiste, especialmente, em submeter os objetos de estudo à influência de certas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável produz no objeto (GIL, 2008).

Segundo Prodanov e Freitas (2013) a pesquisa descritiva visa descrever as características de determinada população ou fenômeno ou o estabelecimento de relações entre variáveis.

O estudo foi realizado na Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Reis Veloso, Parnaíba, Piauí. Este subprojeto emerge de um projeto, no qual foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CEP/UFPI), com parecer n° 385/17.

### **2.3.2 Animais**

Nesta pesquisa, foram utilizados 16 ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*) com peso  $210,3 \pm 24,4$  g. Os animais foram alojados em uma sala com temperatura controlada, em torno de  $20 \pm 2$  ° C, com ciclo claro / escuro de 12 horas e acesso ad libitum a água e alimentos.

### **2.3.3 Delineamento experimental**

Os ratos foram divididos de forma aleatória em dois grupos de oito: o grupo dieta padrão (sem dieta hipercalórica) e o grupo dieta hipercalórica (com dieta hipercalórica, por 20 dias). O grupo dieta padrão foi alimentado com uma dieta composta de água e ração *ad libitum*. Enquanto que o grupo dieta hipercalórica foi alimentado por uma dieta composta de 80% gordura vegetal (Bunge®), 20% de sacarose (União®), água e ração *ad libitum*. Antes da eutanásia foi mensurado o peso dos animais e após o procedimento foi realizada a pesagem dos fígados.

### **2.3.4 Eutanásia**

A eutanásia dos animais foi de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Antes da anestesia, o peso corporal foi registrado. A anestesia foi feita com injeção intramuscular com uma solução de 35 mg/kg de quetamina (Francotar-Virbac®) e 15 mg/kg de Xilasina (Rompum-Bayer®) a 2%. Os níveis de glicose capilar foram medidos e as amostras de sangue foram colhidas do plexo retro-orbital com a utilização de capilares, nos animais anestesiados, com a obtenção média de 2 ml de sangue por animal. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas em uma velocidade de 4000 rpm durante 10 minutos para a posterior separação do soro que foram utilizadas para as dosagens bioquímicas. O tecido do fígado foi pesado e dividido em duas partes: o lóbulo menor para bioquímica e o lóbulo maior para histologia. Após a divisão, os tecidos foram armazenados em formaldeído 10% e refrigerados a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.5 Avaliação histopatológica do fígado**

Na a avaliação histológica as amostras do fígado foram armazenadas em formaldeído tamponado a 10% e processadas segundo Vasconcelos et al., (2017). Este processamento consistiu na passagem das cassetes histológicas por banho sucessivos com o seguinte protocolo: desidratação, soluções crescentes de álcool etílico; diafanização, solução de xilol; inclusão, impregnação por parafina; microtomia, cortes histológicos seriados das amostras incluídas em 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Preparado para 16 animais, o qual foi examinado por microscopia de luz (Nova®).

Na análise histopatológica do fígado, imagens de campo das lâminas histológicas foram avaliadas para gordura hepática, inflamação e necrose, que foi classificada como esteatose (a porcentagem de células hepáticas contendo gordura), seguindo uma escala de 5 graus: 0, ausente ou presente em <5% de hepatócitos; grau 1  $\geq 5\%$  e <25%; grau 2,  $\geq 25\%$  e <50%; grau 3,  $\geq 50\%$  e <75% e grau 4,  $\geq 75\%$ . A análise de necrose e inflamação seguiu a seguinte classificação: 0: nenhuma; 1: <2 focos / campo; 2: 2-4 focos / campo; 3:> 4 focos / campo (KLEINER, 2005).

### **2.3.6 Dosagens**

#### **2.3.6.1 Níveis de Malondialdeído (MDA)**

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo. É o principal indicador da peroxidação lipídica determinado por titulação contra o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é indicador de dano celular. Os níveis de MDA do tecido hepático foram analisados segundo o método descrito por Mihara e Uchiyama (1978).

As amostras de fígado foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a coleta e foram lavadas com soro fisiológico gelado ( $4^{\circ}\text{C}$ ), para extrair quaisquer vestígios de sangue. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em KCl gelado 1,15. Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada de cada amostra e acrescida 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1%). Logo após, a mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo e em seguida adicionado 4,0 ml de N-butanol. Após 2 minutos de agitação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. Por meio de espectrofotometria (comprimento de onda 520 nm e 535 nm) foi medida a absorvância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica). A diferença entre os valores obtidos de cada leitura, resultantes de cada comprimento de onda foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012).

#### **2.3.6.2 Níveis de Mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada principalmente nos neutrófilos que tem sido usada extensivamente como um marcador bioquímico para infiltração de granulócitos em tecidos. Aqui mensuramos a atividade da mieloperoxidase para avaliar o acúmulo de neutrófilos no fígado (CHAVES et al., 2013). Foram pesadas 40 mg de tecido, sendo posteriormente macerados e homogeneizado em 50 mg/ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). A solução foi centrifugada a 4000 rpm durante 6 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por fim, o sobrenadante foi transferido para uma placa de ELISA para a posterior leitura da absorvância de 450 nm demonstrando a atividade enzimática, com a utilização do

dicloridrato de O-dionisidina em reação com peróxido de hidrogênio a 1% (CHAVES et al., 2013).

### 2.3.6.3 Níveis de Glutationa (GSH)

Os níveis de GSH em amostras de fígado foi estabelecida de acordo com o método de Sedlak e Lindsay (1968), que consiste na reação do grupo sulfidril com 5,5' – ditiobis (2 - ácido nitrobenzóico) (DTNB– reagente de Ellman) com o tiol livre, que resulta em um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. O produto resultante foi calculado por meio de espectrofotometria (absorbância a 412nm) (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Foram pesados entre 50 a 100 mg das amostras de fígado que em seguida foram homogeneizadas em 5 ml de EDTA 0,02M gelado. Foram retirados 4,0 ml deste homogeneizado, que foi misturado com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. Do sobrenadante foi retirado 2,0 ml, neste foi acrescido 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M. Posteriormente, as amostras preparadas foram agitadas e misturadas para a homogeneização. Por fim, foram lidas as absorbâncias das amostras no espectrofotômetro (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Os dados foram apresentados como  $\mu\text{g/g}$  de tecido.

### 2.3.6.4 Dosagens bioquímicas do soro

Na dosagem bioquímica, foram recolhidas amostras de sangue do plexo retro-orbital que foram armazenadas e refrigeradas. Posteriormente foram centrifugadas para obtenção de 100 $\mu\text{l}$  de soro, para avaliação e análise dos seguintes exames: ALT, AST, uréia, ácido úrico, albumina, fosfatase alcalina, cálcio, HDL e colesterol total. Os níveis séricos foram medidos com um kit de ensaio comercial imunoenzimático Labtest específico para cada marcador (Tabela 1).

**Tabela 1.** Kits Imunoenzimático para Marcadores.

Marcador	Kit Imunoenzimático	Finalidade
ALT	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para medida da atividade da Transaminase Oxalacética (TGO) em amostra de sangue por método cinético de tempo fixo e

---

		medição de ponto final.
AST	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para medida da atividade da Transaminase Piruvica (TGP) em amostra de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.
ALB	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para a determinação da albumina em amostras de soro por reação de ponto final.
FAL	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para determinação da Fosfatase Alcalina em amostras de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de pontofinal.
AU	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema enzimático para determinação do ácido úrico por reação de ponto final em amostras de sangue.
CT	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema enzimático colorimétrico para a determinação de colesterol total em amostras de soro, com reação de ponto final.
HDL	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) e determinação do Colesterol HDL por reação de ponto final.
CA	Labtest <sup>&amp;</sup>	Sistema para a determinação do cálcio por reação de ponto final em amostras de sangue e urina.

---

<sup>&</sup> Labtest®, Belo Horizonte, MG, Brasil.

As amostras provenientes do fígado foram analisadas no Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS) da Universidade Federal do Piauí.

### 2.3.7 Análise estatística

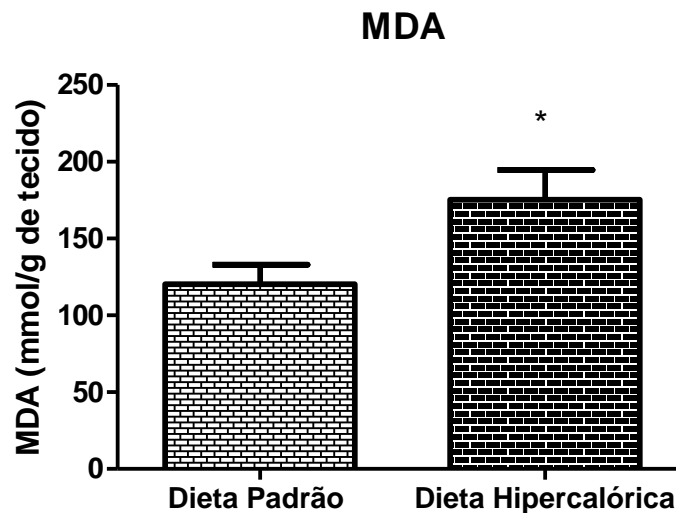
Os dados são expressos como desvio padrão da média e / ou mediana. A distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os dois grupos foram analisadas usando testes U de Mann-Whitney para dados não paramétricos e testes t de Student não pareados para dados paramétricos.

## 2.4 RESULTADOS

### *Níveis de MDA no tecido Hepático*

Na comparação entre grupos dieta padrão e o grupo dieta hipercalórica, os níveis de MDA apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O grupo dieta hipercalórica apresentou aumento na peroxidação lipídica quando comparado ao grupo dieta padrão (Dieta padrão com  $120,2 \pm 12,86$  mmol/g de tecido e dieta hipercalórica com  $175,4 \pm 19,24$  mmol/g de tecido) (Figura 5).

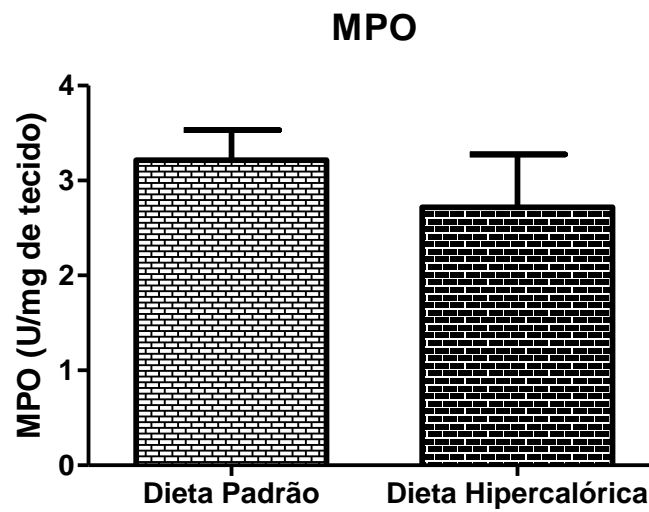
**Figura 5.** Níveis de malondialdeído no tecido hepático. \* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



### *Níveis de MPO no tecido hepático*

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos do estudo em relação aos níveis de MPO no tecido hepático ( $3,215 \pm 0,3180$  U/mg de tecido,  $2,8 \pm 0,6$  U/mg de tecido, grupos dieta padrão e dieta hipercalórica, respectivamente ( $p > 0,05$ )) (Figura 6).

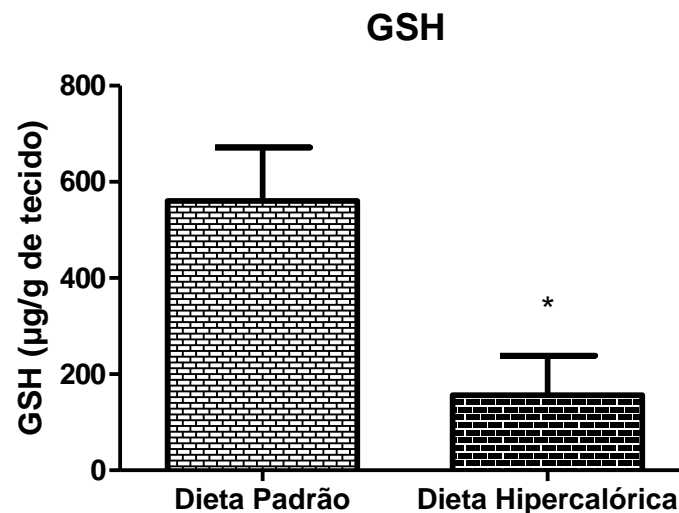
**Figura 6.** Níveis de MPO no tecido hepático.



### ***Níveis de GSH no tecido hepático***

O grupo dieta hipercalórica demonstrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de GSH no fígado ( $156,0 \pm 82,25 \mu\text{g/g}$  de tecido) em relação ao grupo dieta padrão ( $560,0 \pm 111,4 \mu\text{g/g}$  de tecido) (Figura 7).

**Figura 7.** Níveis de glutatona no tecido hepático. \*Diferença significativa ( $P < 0,05$ ).



### ***Peso corporal e do fígado dos animais***

O grupo dieta hipercalórica apresentou um maior valor do peso corporal ( $210,4 \pm 8,637$ ) em comparação com o grupo dieta padrão ( $207,1 \pm 3,435$ ), porém não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). A comparação entre os dois grupos em

relação ao peso do fígado não demonstrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Peso Corporal e Peso Hepático.

<b>Grupo</b>	<b>Peso corporal</b>	<b>Peso do fígado</b>
<b>Dieta padrão</b>	207,1 ± 3,435	7,131 ± 0,1995
<b>Dieta hipercalórica</b>	210,4 ± 8,637	7,310 ± 0,3430

### ***Dosagens bioquímicas do soro***

As dosagens bioquímicas de ALT, albumina, colesterol total, ácido úrico, cálcio, e HDL apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo dieta padrão e o grupo dieta hipercalórica. O grupo dieta hipercalórica apresentou um aumento nas concentrações de ALT, albumina, colesterol, ácido úrico, cálcio e uma diminuição no AST e HDL em relação ao grupo dieta padrão (Tabela 3).

**Tabela 3.** Dosagens bioquímicas do soro dos animais.

<b>Marcadores</b>	<b>Dieta padrão</b>	<b>Dieta hipercalórica</b>
<b>ALT</b>	32,63 ± 2,655	49,43 ± 2,660*
<b>AST</b>	82,39 ± 18,23	67,55 ± 6,774
<b>ALB</b>	3,389 ± 0,09782	4,050 ± 0,2860*
<b>CT</b>	87,50 ± 8,211	106,9 ± 11,99*
<b>AU</b>	0,8125 ± 0,1894	4,763 ± 1,454*
<b>UREIA</b>	40,01 ± 2,196	34,46 ± 1,881
<b>FAL</b>	83,00 ± 7,206	102,3 ± 9,615
<b>HDL</b>	24,67 ± 0,8333	23,88 ± 1,922*
<b>CA</b>	10,13 ± 0,1650	12,56 ± 0,6383*



\*Dosagens bioquímicas com diferença significativa ( $P < 0,05$ ). ALT: alanina amino transferase, AST: aspartato amino transferase, ALB: albumina, CT: colesterol total, AU: ácido úrico, FAL: fosfatase alcalina, HDL: lipoproteína de alta densidade, CA: cálcio.

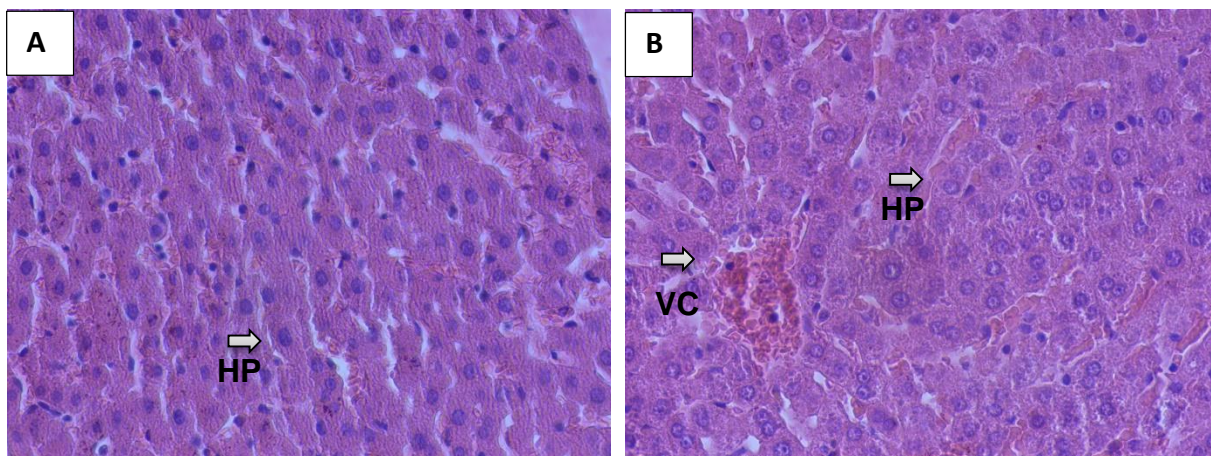
### ***Glicemia Capilar***

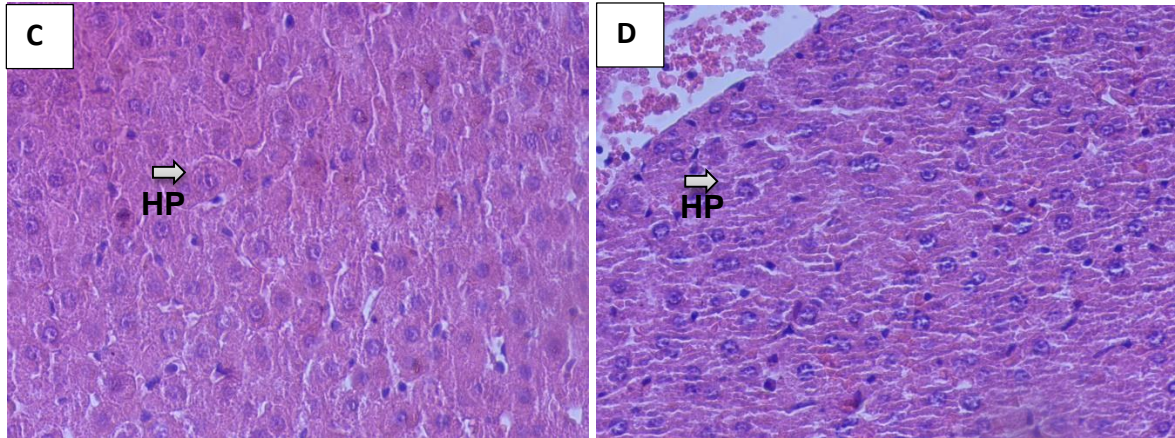
Não houve diferença significativa da glicemia entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Grupo dieta padrão ( $226,6 \pm 14,84$ ) e grupo dieta hipercalórica ( $213,0 \pm 14,9$ ).

### ***Avaliação histopatológica do fígado***

A Figura 8A e 8B demonstra o tecido hepático do grupo dieta padrão, no qual os hepatócitos apresentam conformação normal. No grupo dieta hipercalórica (Figura 8C e 8D) foi observado um início de esteatose e inflamação. A análise dos escores de esteatose dos tecidos hepáticos de ambos os grupos demonstrou valores baixos de esteatose e inflamação (Tabela 4). Não houve diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

**Figura 8.** Avaliação histopatológica do tecido hepático.





**Legenda:** A e B grupo dieta padrão, apresentando veia central e hepatócitos com conformação normal. C e D grupo dieta Hipercalórica, apresentando esteatose microvesicular. As setas indicam veia central (VC), sinusoides (SN) e hepatócitos (HP). Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), ampliação original X150.

**Tabela 4.** Avaliação histopatológica do fígado.

<b>Grupos</b>	<b>Dieta Padrão</b>	<b>Dieta hipercalórica</b>
<b>Escore de Esteatose</b>	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)
<b>Escore de Inflamação</b>	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)
<b>Escore de Necrose</b>	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)

Não houve diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

## 2.5 DISCUSSÃO

A DHC é bem conhecida por induzir alguns transtornos metabólicos, e as consequências são completamente dependentes de sua composição e duração (BUETTNER, 2006; GHIBAUDI, 2002). Uma dieta rica em gordura, consistindo tipicamente de 30 a 60% de gordura, é comumente usada de forma experimental para induzir DHGNA em roedores. No entanto, a quantidade de gordura, a composição e a duração da dieta podem causar diferentes respostas em relação à obesidade, intolerância à glicose, dislipidemia, aumento da lipogênese, produção de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, dependendo da espécie, linhagem e gênero (TAKAHASHI, SOEJIMA, FUKUSATO, 2012; KANURI, BERGHEIM, 2013). Neste estudo, observou-se que 20 dias de oferta de dieta hipercalórica, em um modelo experimental, foi capaz de gerar alterações metabólicas similares a DHGNA, porém este modelo não foi capaz de provocar alterações teciduais suficientes que se caracterizasse nos escores histopatológicos hepáticos.

Mcdonald SD. et al, (2011) relata que o uso de uma DHC em estudos de curto prazo, como tem sido comumente feito em animais, não reflete adequadamente os padrões dietéticos, com consequentes distúrbios metabólicos. Secções hepáticas avaliadas histologicamente mostram um escore baixo, no qual foi evidenciado um início de acumulação de gordura e inflamação nos hepatócitos da maioria dos animais (Figura 9C e 9D). Esse resultado demonstra que o período não foi suficiente para a instalação da lesão hepática, uma vez que a principal característica histológica da DHGNA, como o próprio nome indica, é o acúmulo de gordura na forma de triglicérides dentro dos hepatócitos, uma lesão originalmente denominada “esteatose”. A presença de > 5% de hepatócitos esteatóticos em uma seção de tecido hepático é aceita como o critério mínimo para o diagnóstico histológico da DHGNA (BRUNT EM, TINIAKOS DG, 2009).

No atual modelo de dieta, houve uma diminuição significativa do GSH no grupo dieta hipercalórico quando comparado com o grupo dieta padrão. A depleção de GSH tem sido considerada há muito tempo como um papel causal na disfunção celular relacionada ao estresse oxidativo / morte celular (DOU et al., 2018). O estresse oxidativo é considerado de importância primária na progressão da doença, desde esteatose simples até esteato-hepatite e dano hepático (TAKAKI A, KAWAI D, YAMAMOTO K., 2013).

O conteúdo de MDA reflete a lesão da peroxidação lipídica tecidual e indiretamente reflete a gravidade do ataque dos radicais livres (KHAN RA, KHAN MR, SAHREEN S, KHAN et al, 2015; WU, LI, WEN, 2007). O MDA é o principal produto da degradação da peroxidação lipídica, podendo reagir com proteínas de membrana e enzimas, aumentar a permeabilidade da membrana, alterar a estrutura, função e metabolismo das membranas celulares e causar danos ao corpo. Os resultados evidenciaram um aumento significativo da peroxidação lipídica hepática, conforme evidenciado pela elevação dos níveis de MDA no grupo dieta hipercalórica em comparação ao grupo dieta padrão. Esse é um achado relevante, uma vez que vários estudos clínicos demonstraram que os níveis elevados de produtos circulantes de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, (POLIMENI L, et al., 2015) bem como a diminuição dos níveis de antioxidantes estão presentes na DHGNA (YESILOVA Z, et al., 2005).

Estudos anteriores relataram uma atividade de MPO significativamente maior no tecido hepático na presença da DHGNA, indicando o aumento da gravidade da inflamação (KULKARNI et al., 2014). A mudança nas atividades dessas enzimas pode ser usada como indicador de estresse oxidativo dentro das células hepáticas (LY et al., 2017). Em nosso estudo, a atividade de MPO não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados. A ausência de diferenças entre os grupos quanto à inflamação evidenciado no escore histopatológico pode explicar os dados da atividade de MPO no fígado.

As aminotransferases séricas, especialmente a ALT, tornou-se o biomarcador padrão para a detecção de lesão hepática (THULIN P, 2008). Os dados da análise bioquímica mostraram uma elevação nos níveis de ALT e uma diminuição dos níveis de AST do grupo dieta hipercalórica em relação ao grupo dieta padrão, o que mostra uma associação com a progressão da doença, pois está em concordância com estudos anteriores, em que as atividades séricas de AST e ALT são marcadores bioquímicos bem documentados para a presença de DHGNA (YULONG WU et al., 2018). Os níveis de ALT acima do limite superior do normal e os níveis de AST inferiores aos da ALT são achados típicos que apoiam a presença de DHGNA (SATTAR N, FORREST E, PREISS D, 2014).

Está bem estabelecido que a DHGNA esteja intimamente associada a anormalidades lipídicas (KEEFE EB, 2001). No estudo os níveis de colesterol total

mostrou uma diferença significativa entre os grupos, apresentando níveis mais elevados no grupo dieta hipercalórica. Evidências recentes sugerem que o colesterol dietético é um fator crítico no desenvolvimento de DHGNA experimental em modelos animais e que o metabolismo do colesterol é significativamente alterado, refletido pela diminuição da absorção e aumento da síntese de colesterol (NEUMAN MG, COHEN LB, NANAU RM, 2014), nossos resultados estão em concordância com esses dados.

Sabe-se que a dislipidemia em pacientes com DHGNA está relacionada com a diminuição dos níveis de HDL (KRISHAN S., 2016). Este estudo mostrou que houve uma diminuição do HDL no grupo dieta hipercalórica em relação ao grupo dieta padrão, apresentando diferença significativa entre os grupos.

A deposição de lipídios no fígado leva ao comprometimento da função hepática. O conteúdo reduzido de albumina, observado em um estudo que usou ratos com DHGNA, correlacionou-se diretamente com a deposição lipídica no fígado. A albumina é a proteína sérica circulante mais abundante. O conteúdo de albumina sérica tem sido usado como teste para a função hepática. A síntese de albumina é uma função característica das células saudáveis do fígado (NOUREDDIN MD, ROHIT L, 2012; MIKOLASEVIC et al., 2014). Na comparação entre os grupos do estudo foram evidenciadas diferenças significativas. A ausência de esteatose evidenciado no escore histopatológico pode explicar os dados da análise bioquímica da albumina.

Altas concentrações de ácido úrico induz a acumulação de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias dos hepatócitos, conduzindo finalmente a lesões mitocondriais, sendo o ácido úrico um fator de risco para DHGNA (THULIN P et al, 2008). No estudo, os níveis de ácido úrico mostraram uma elevação no grupo dieta hipercalórica, apresentando diferença significativa entre os grupos. Esse achado corrobora com outros estudos que relatam que níveis elevados de AU podem aumentar cerca de duas vezes o risco de desenvolver a DHGNA (HU, XIAO-YU et al., 2018).

O fígado é fonte de muitas proteínas e é o regulador de várias vias que envolvem o metabolismo ósseo. Evidências crescentes sugerem baixa desmineralização óssea em pacientes com DHGNA (ESHRAGHIAN, 2017). Os resultados evidenciaram que houve um aumento dos níveis de Ca no grupo dieta

hipercalórica em relação ao grupo dieta padrão, apresentando diferença significativa entre os grupos. Vários estudos demonstraram que indivíduos com marcadores inflamatórios elevados apresentam menor desmineralização óssea na DHGNA (HOTAMISLIGIL, 2006). A ausência de inflamação evidenciada no escore histopatológico pode explicar os dados de Ca.

Este estudo serviu para observar que o modelo de dieta hipercalórica não provocou DHGNA, enfatizando o modelo de dieta hipercalórica como um instrumento que pode ser usado para testar outras comorbidades.

## **2.6 CONCLUSÃO**

Com este estudo foi possível observar que os danos hepáticos decorrentes da dieta hipercalórica experimental em ratos não apresentam extensão e severidade associados com a DHGNA. Em virtude disso, ressalta-se que esse modelo permite estudar a associação entre a DHC com outras comorbidades.

## **3 CAPÍTULO II**

### **ARTIGO DE REVISÃO**

#### **Relação entre dieta experimental em ratos e doença hepática gordurosa não alcoólica: revisão da literatura**

Ayane Araújo Rodrigues<sup>1</sup>, Raissa Bacelar Andrade<sup>2</sup>, and Daniel Fernando Pereira Vasconcelos<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em ciências Biomedicas, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biomedicina, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil.

Correspondência deve ser endereçada a Daniel F.P.Vasconcelos; vasconcelos@ufpi.edu.br

### **RESUMO**

**Introdução:** A fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) está relacionada a estilos de vida não saudáveis que combinam estilo de vida sedentário, dietas hipercalóricas, gorduras saturadas em excesso, carboidratos refinados e alto consumo de frutose como aditivo alimentar para vários produtos processados. Tanto o reconhecimento mais amplo da doença como os esforços adicionais para elucidar a patogênese da DHGNA levaram a um aumento nos modelos animais nos últimos anos. **Objetivo:** Esta revisão foi realizada para fornecer uma melhor compreensão da associação entre a NAFLD e modelos animais. **Métodos:** A busca na literatura ocorreu antes de maio de 2018 no banco de dados Cochrane Library, Google Scholar e PubMed. **Resultados:** A maioria dos estudos que investigam a influência da dieta no conteúdo de gordura do fígado tem feito uma dieta de alto teor calórico que leva a um aumento significativo no teor de gordura no fígado. **Conclusão:** Os achados desta revisão mostram que a dieta é um dos fatores que predispõe ao aparecimento da DHGNA e que os estudos apresentaram uma ampla variedade de desenhos.

### **1.Introdução**



A prevalência de doenças metabólicas preditivas, especialmente dislipidemias e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), tem aumentado em todo o mundo [1,2]. A DHGNA e as doenças metabólicas associadas à obesidade, diabetes mellitus e dislipidemia são um problema crescente de saúde pública nos Estados Unidos e no mundo [3]. A população global é afetada pela DHGNA, com taxas entre 25% e 30%, com maior prevalência no Oriente Médio e na América do Sul. Na América do Norte e na Europa, um quarto da população adulta é afetada pela DHGNA [4]. É uma das principais causas de transplante hepático e, em 2030, prevê-se que seja uma das razões mais comuns para o transplante nos Estados Unidos [5].

Esta patologia chamou a atenção nos últimos anos. O diagnóstico clínico e a avaliação da DHGNA podem ser realizados com base no exame físico, história da doença, exame ultra-sonográfico e imagem hepática [6].

Embora outros testes não invasivos tenham sido sugeridos, eles ainda devem ser validado em grandes escalas [1]. A DHGNA apresenta um episódio de hepatopatia variável de esteatose simples à hepatite não alcoólica EHGNA, que é localizada na presença de hepatite e inflamação, relacionada à morte de hepatócitos, muitos pacientes evoluem para fibrose insuficiente / cirrose e insuficiência hepática [7]. A DHGNA é diagnosticada histologicamente quando > 5% dos hepatócitos / campo apresentam acúmulo de lipídios. Essa é a média do diagnóstico padrão-ouro e deve ser considerada em pacientes com DHGNA que apresentam alto risco de fibrose e esteato-hepatite [8,9].

A fisiopatologia da DHGNA está associada a estilos de vida não saudáveis, que combinam estilo de vida sedentário, dietas hipercalóricas, excesso de gordura saturada, carboidratos refinados e alta frutose em aditivos alimentares para vários produtos processados [10,11]. Embora as etiologias das dislipidemias e a DHGNA sejam complexas e multifatoriais, essas doenças contêm um importante componente genético que é influenciado pelos fatores ambientais e hábitos de vida, especialmente o perfil de consumo alimentar [2,12].

O melhor conhecimento da doença e seus dados complementares para elucidar a patogênese da DHGNA levaram a um aumento nos modelos animais nos últimos anos [13,14]. Levando em consideração o aumento de estudos com DHGNA, o objetivo deste estudo foi investigar os diferentes delineamentos de estudos que

direcionaram a relação da dieta com o surgimento da DHGNA experimentalmente em ratos.

Levando-se em conta o aumento nos estudos com DHGNA, o objetivo deste estudo foi investigar os diferentes delineamentos do estudo que direcionaram a relação da dieta com o surgimento da DHGNA experimentalmente em ratos.

## **2. Materiais e Métodos**

Esta revisão foi realizada de acordo com a declaração PRISMA (Itens de Relatórios Preferenciais para Revisões Sistemáticas e MetaAnálises ) de acordo com Mheraton, 2009. [15].

### **2.1. Critérios de Elegibilidade**

Para a elegibilidade das publicações, cada título e resumo foram lidos de forma exaustiva para confirmar se abordavam a questão norteadora desta pesquisa e se atenderiam aos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. Então, o mesmo aconteceu com o estágio de inclusão dos artigos. A seleção dos estudos é mostrada na Figura 1. Na identificação e triagem, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: endereço eletrônico fixo, ser gratuito, estar integralmente apresentado e ser divulgado em inglês, português ou espanhol. Investigações que não apresentavam informações suficientes sobre a DHGNA foram excluídas. Além disso, dissertações, teses, reportagens, notícias, cartas do editor e artigos científicos não disponíveis on-line e aqueles que foram repetidos nas bases de dados foram excluídos. Estudos que utilizaram dieta induzindo doença hepática alcoólica (ALD) também foram excluídos.

### **2.2. Procurar estratégia.**

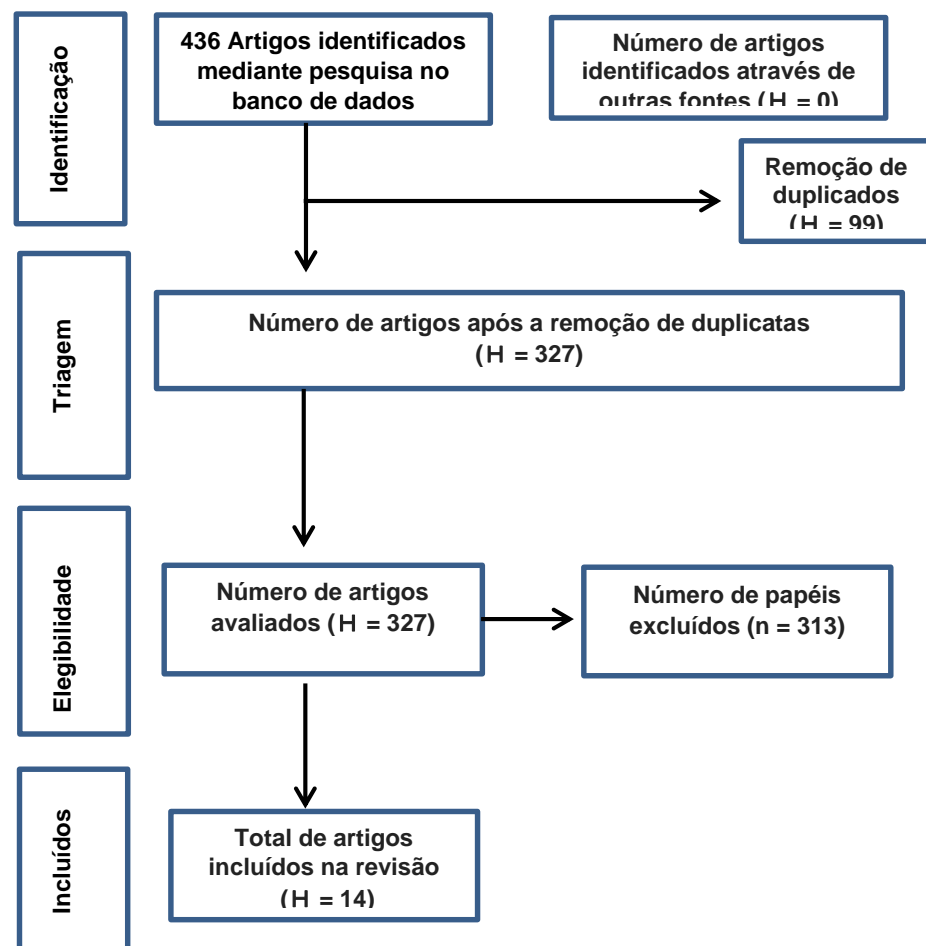
As palavras-chave ou descritores a seguir foram utilizados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Biblioteca Virtual em Saúde: “NAFLD”, “diet” e “ratmodel”. A busca na literatura foi realizada por dois pesquisadores nas bases de dados: Cochrane Library, Google Scholar e PubMed para estudos publicados antes de 28 de maio de 2018 e abordando a DHGNA associada ao modelo de ratos. As seguintes palavras-chave combinadas foram reutilizadas para pesquisar a literatura:

(“NAFLD”, “dieta” e “modelo de rato”). A Figura 1 demonstra a estratégia de pesquisa e os detalhes da revisão.

### 3. Resultados

Por meio da busca realizada no PUBMED, foram encontrados 436 artigos, dos quais 89 não tinham relação com o tema, 8 artigos foram repetidos, 2 artigos não estavam disponíveis, 2 artigos foram excluídos devido à dieta utilizada, que induz a doença hepática alcoólica (DHA) e, portanto, não foi o foco desta revisão, e 313 estavam relacionados ao tema, mas estavam testando outros compostos. Dessa forma, 14 artigos foram analisados (Figura 1). Em relação ao periódico e linguagem, todos foram publicados em revistas internacionais com a língua inglesa.

**Figura 1. Fluxograma das fases da pesquisa.**



Quanto aos artigos que discutem a dieta e o início da DHGNA, 1 utilizou dieta enriquecida com frutose (Ackermanetal, 2005) [15]; 2 induzam esteato-hepatite

através da dieta deficiente em metionina-colina (Kirsch et al., 2003; Wu et al., 2011) [16, 21]; 1 utilizou a dieta rica em gordura associada à sacarose (Torres Vilalobos et al., 2015) [23]; 1 utilizou dietas hiperlipídicas, frutose e rica em gorduras associadas à frutose (Lee et al., 2015) [24]; 2 usaram a dieta hiperlipídica (Zou et al., 2006; McDonald, 2011) [17, 20]; 2 usaram dieta hiperlipídica e deficiente em metionina (Xu et al., 2010; De Lima, 2008) [18, 19]; 1 utilizou dieta e gordura rica e dieta deficiente em metionina e colina (Han et al., 2017) [28]; 4 revisaram modelos experimentais que induzem DHGNA (Kucera, Cervinkova, 2014; Eslamparast et al., 2017; Goossens, 2017; Mikhail et al., 2017) [22, 25-27]. Os respectivos dados são apresentados na Tabela 1.

<b>AUTORES</b>	<b>TITULO DO ARTIGO</b>	<b>ANO DE PUBLICAÇÃO</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>MODELO DE DIETA</b>
Kirsch et al.	Modelo nutricional de roedores de esteato-hepatite não alcoólica: estudos de espécies, estirpes e diferenças de sexo	2003	Investigar as diferenças entre espécies, linhagens e sexo no modelo nutricional de dieta deficiente em metionina colina para induzir esteato-hepatite não alcoólica (NASH).	Foram alimentados com a dieta pobre em metionina e colina, grupo controle receberam uma dieta idêntica à qual foi adicionado bitartarato de colina (2 g / kg) e DL-metionina (3 g / kg).
Ackerman et al.	Doença Hepática Gordurosa Induzida por Frutose Efeitos Hepáticos da Pressão Arterial e Redução de Triglicérides Plasmáticos	2005	Caracterizar patologia e função hepática, composição lipídica hepática e concentração hepática de ferro) e alterações plasmáticas de insulina em jejum que ocorrem em ratos como resultado da dieta enriquecida com frutose , com e sem manobras terapêuticas para reduzir a pressão arterial e triglicérides do	Dieta enriquecida com frutose. (como fornecido por Harlan Teklad) 20,7% (por base de peso) de proteína (como caseína), 5% de gordura (como banha de porco), 60% de carboidratos (como frutose), 8% de celulose, 5% de mistura mineral e 1% de mistura de vitaminas. Esta dieta contém 50 mg de ferro em 1 kg de dieta. Por 5 semanas.

			plasma.	
Zou.et al.	Modelo de rato induzido por emulsão rica em gordura de esteato-hepatite não-alcoólica	2006	O objetivo do presente estudo é produzir um modelo de rato experimental prático e repetitivo para esteato-hepatite, projetando uma emulsão rica em gordura que contém alto teor de gordura, sacarose e proteína.	Os ratos foram divididos em grupo controle normal (grupo NC) e grupo modelo de emulsão hiperlipídica (grupo HF). Todos os ratos receberam ração padrão para roedores e água. Além disso, eles tiveram acesso livre a uma solução de sacarose (18%). Os ratos modelo foram tratados oralmente com a emulsão de alto teor de gordura (10 ml / kg) uma vez por dia. Por 6 semanas.
De Lima et al.	Um modelo de roedores de NASH com cirrose, proliferação de células ovas e carcinoma hepatocelular	2008	Procuramos produzir um modelo de rato de NASH, cirrose e HCC.	Dieta rica em gordura (35% de gordura total, 54% de ácido graxo trans) e deficiente em colina por 16 semanas.
Xu, Zheng-Jie et al.	Caracterização da Esteato-Hepatite Não-alcoólica com Alto Teor de Gordura, Induzida por Dieta e Fibrose em Ratos	2010	Nosso objetivo foi criar um novo modelo de rato NASH, alimentando os animais com uma dieta caseira com alto teor de gordura (DHC), com a esperança de reproduzir as principais características da NASH humana para futuras pesquisas.	A DHC foi composta pelas seguintes fontes de energia: 52% foram fornecidos por carboidratos, 30% por gordura e 18% por proteína (calorias totais: 4,8 kcal /g). Comparação com a dieta deficiente em metionina-colina.
McDonald et al.	Efeitos metabólicos adversos de uma dieta hipercalórica e rica em gordura em roedores precedem mudanças observáveis no peso corporal	2011	*O objetivo específico foi determinar o impacto de uma exposição ao longo da vida a um hipercalórico, DH sobre a adiposidade, sua distribuição e seus	Dieta hiperlipídica com 5% de energia de gordura no grupo controle e uma dieta hipercalórica, rica em 41% de gordura, por 39 semanas.

---

			marcadores de controle glicêmico.	
Wu et al.	Esteatose hepática: um modelo experimental para quantificação	2011	Introduzir um método experimental para quantificar a esteatose hepática em ratos, e fornecer um modelo experimental alternativo nas seguintes pesquisas.	Dois grupos e alimentados com dieta comercial e dieta deficiente em colina / metionina (DMC) por duas semanas.
Kucera, Cervinkova,	Modelos experimentais de doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos	2014	Este artigo revisa os modelos experimentais amplamente utilizados da NAFLD em ratos. Discutimos os modelos nutricionais, genéticos e combinados da DHGNA e seus prós e contras.	Dietas ricas em gordura; Dieta rica em frutose / sacarose; Dieta deficiente em metionina e colina; dietas aterogênicas; Modelos genéticos e combinados.
Torres-Vilalobos G, et al.	Dieta rica em gordura combinada e alto consumo sustentado de sacarose promove a DHGNA	2015	Avaliar o impacto de 4 dietas diferentes na produção de NAFLD com ênfase em um alto consumo combinado de alta gordura e sustentado de sacarose.	1)Dieta controle; 2) Dieta rica em gordura e colesterol + 5% de sacarose na água potável. 3) Dieta rica em gordura de amido de milho + 5% de sacarose na água potável. 4) Dieta alimentar + 20% de sacarose em água potável.Por 90 dias

---

Lee et al.	Desarranjo Histológico e Metabólico em Modelos Animais de Alta Gordura, Alta Frutose e Dieta Combinada	2015	Avaliar e comparar as diferenças na indução de características histológicas e metabólicas induzidas pelas dietas combinadas para caracterizar os modelos de ratos NAFLD e NASH resultantes.	G1: ração normal, G2: dieta hiperlipídica alimentados com uma dieta rica em gordura (60% total de calorias), G3: alta frutose (30% de frutose em água potável) G4: alta combinação de gordura + alta frutose (60% de gordura + 20 % de frutose). Por 20 semanas
Mikhail et al.	Modelos animais de doença hepática gordurosa não alcoólica - um guia para iniciantes	2017	Esta revisão fornecerá uma breve visão geral dos modelos de animais mais frequentemente utilizados na pesquisa e nos cuidados de saúde materna da NDFL, seguindo o modelo de orientação marítima mais abrangente, concentrando-se nas principais características fenotípicas de cada modelo.	Dieta deficiente em metiona e colina; Dieta Deficiente em L-Aminoácidos Deficiente em Colina; Dieta aterogênica; Fructose; Dieta rica em gordura, Variações na dieta rica em gordura
Eslamparast et al.	Composição dietética independente da perda de peso no tratamento de doença hepática gordurosa não alcoólica	2017	Revisão de literatura avaliando as evidências por trás dos componentes da dieta, incluindo dietas ricas em carne, omega e 3 e, dependendo de mais evidências, concordamos com a recomendação das Diretrizes Clínicas EASL-EASO da dieta mediterrânea como a dieta de escolha nestes	Dieta do mediterrâneo, Abordagem dietética para parar a hipertensão (DASH) é um padrão alimentar rico em vegetais, Intervenção de fibra (solúvel, prebiótica), Intervenção Omega-3, Intervenções com Baixo teor de Gordura vs. Baixo-CHO, probióticos,

			pacientes.	
Goossens, jornayvaz	Aspectos translacionais da dieta e da doença hepática gordurosa não alcoólica	2017	Discutir algumas questões-chave dos aspectos translacionais da pesquisa de NAFLD na perspectiva de nutrição e intervenções dietéticas, revisão de literatura.	Dieta com alto teor de gordura, deficiente em metionina; com alto teor de colesterol; alto teor de frutose e cetogênica
Han et al.	Distinção da Perfil Metabolômica da Progressão da Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica Humana a partir de um Modelo Comum de Rato	2017	O objetivo deste estudo foi realizar análises metabolômicas completas em amostras de fígado para determinar quais vias são alteradas de forma mais pronunciada na condição humana, e comparar essas mudanças com modelos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).	Alternadamente, os ratos foram alimentados com dieta rica em gordura (colesterol alto, 18% de gordura de manteiga) ou dieta com deficiência de metionina-colina, por oito semanas.

Modelos dietéticos são considerados mais semelhantes às doenças metabólicas humanas, mas atualmente não há composição padrão e duração dessas dietas: dietas ricas em gordura variam de 30% a 60% de gordura, incluindo gordura saturada, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos saturados de poliun e durar de alguns dias (curto prazo) a mais de uma semana (longo prazo) [29]. Além disso, dietas teoricamente compostas de tipos de gordura idênticos podem produzir resultados diferentes e os dados são frequentemente difíceis de comparar devido a diferenças incontroláveis entre os recursos primários e a preparação da dieta [30].

Observou-se que a maioria dos artigos encontrados na literatura estava relacionada ao tema, mas os estudos utilizaram modelos de dieta animal para induzir a DHGNA com o objetivo de testar compostos que interferissem na progressão da doença.



Ackerman et al. (2005) [15] demonstraram que o modelo de ratos tratados com frutose pode ser um modelo adequado para o estudo de vários aspectos da DHGNA humana, especialmente se associado ao ferro, uma vez que gera um aumento da fibrose hepática. continha 20,7% de proteína, 5% de gordura, 60% de carboidrato (frutose), 8% de celulose, 5% de mistura mineral e 1% de mistura de vitamina, combinados com 50 mg de ferro para cada 1kg de dieta durante o período de 5 semanas. O modelo de frutose-ferro mostrou evidências de deposição leve a moderada de gordura macrovesicular e microvesicular com sinais mínimos de fibrose perissinusoidal em 3 de 12 ratos.

De Lima et al. (2008) [18] propuseram uma dieta rica em gordura (35% de gordura total, 54% de ácido transcutâneo) e deficiente em colina por 16 semanas. Este modelo demonstrou o desenvolvimento de NASH histológica com cirrose, proliferação de células ovais e carcinoma hepatocelular CK-19 positivo. Em 2009, Xu et al. [19] testaram uma dieta rica em gordura em ratos e os níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol, alanina aminotransferase (ALT), ácidos graxos livres (AGL), insulina e fator de necrose tumoral (TNF-alfa) foram determinados. A histologia hepática também foi examinada por H & Estain. O peso do fígado e o índice do fígado aumentaram em um mês, quando a esteatose hepática também foi observada. No 2º mês, o peso corporal e o peso da gordura epididimária começaram a aumentar, o que foi associado ao aumento dos níveis séricos de AGL, colesterol e TNF-alfa, bem como ao desenvolvimento de esteatose hepática. O nível sérico de ALT aumentou a partir do terceiro mês. A esteato-hepatite ocorreu após três meses. Portanto, este modelo é recomendado para o estudo da NASH e suas implicações.

O estudo de Wu et al. (2011) [21] e posteriormente Han et al. (2017) [28] utilizaram uma dieta deficiente em colina / metionina (metionina 0,15%, colina 20 ppm e 12% de componente lipídico) por 2 semanas. e concluíram que os pesquisadores podem medir diretamente o grau de esteatose com menor preocupação com a infiltração gordurosa heterogênea e, além disso, fornecer uma medida contínua, mas não categórica, de esteatose hepática.

A dieta deficiente em metionina e colina (MCD) no estudo de Kirsch et al. (2003) [16] foi composto por 2g / kg de colina e 3g / kg de metionina por 4 semanas. A pesquisa demonstrou profundas diferenças entre espécies, linhagens e sexo no modelo nutricional de MCD de NASH. Dos grupos estudados, os camundongos C57

/ BL6 machos desenvolveram as características histológicas que mais se assemelham àquelas observadas na NASH humana.

Segundo McDonald et al. (2011) [20], a dieta rica em caloria e rica em gorduras com 41% de energia gordurosa foi capaz de aumentar a gordura intra-abdominal, que precedeu um aumento no peso corporal total e foi acompanhada por anormalidades metabólicas, incluindo níveis elevados de triglicérides e hiperglicemia em resposta ao desafio de aglutinação.

Zou et al. (2006) [17] também afirmaram que o modelo de dieta hipercalórica (77% de desconto na atenuação, 14% do leite em pó total e 9% de carboidratos) oferece novas oportunidades para o estudo da patogênese e tratamento da síndrome metabólica associada à esteato-hepatite. como obesidade, aminotransferase anormal, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina. A progressão da DHGNA também deve ser alta, com potencial para avançar para esteato-hepatite ou mesmo cirrose, como visto na Figura 2. Foi demonstrado que a dieta hipercalórica os modelos mostraram o mesmo perfil metabólico observado em humanos, como níveis aumentados de insulina, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperleptinemia, intolerância à glicose e aumento dos níveis de adiposidade visceral branca [17,31].

O estudo de Kucera e Cervinkova [22] teve como objetivo revisar várias dietas usadas para desenvolver DHGNA e discutir modelos nutricionais, genéticos e combinados de DHGNA, bem como prós e contras. A escolha de um modelo animal adequado para essa doença, respeitando suas limitações, pode ajudar a entender sua complexa patogênese e descobrir novas estratégias terapêuticas.

Em 2015, Torres-Vila lobos e outros [23] teve como objetivo avaliar o impacto de quatro diferentes dietas sobre a produção de NAFLD com ênfase no alto consumo combinado de sacarose rica em gordura e sustentada. Sua metodologia utilizou as seguintes dietas: dieta controle, alto teor de gordura e colesterol + 5% de dieta de sacarose em beber água, dieta com alto teor de gordura de amido de milho + 5% de sacarose em água potável e dieta alimentar + 20% de sacarose em água potável por 90 dias. Eles concluíram que a dieta rica em gordura + colesterol com combinação de alto teor de gordura e alta sacarose é mais eficaz na produção de DHGNA, em comparação com uma dieta rica em sacarose.

Lee et al. (2015) [24] observaram as conseqüências de dietas com alto teor de gordura (HF) e alta frutose (HFr) em ratos. A inflamação intra-hepática e desequilíbrios metabólicos foram mais proeminentes no modelo de combinação HF e HFr do que no modelo monodietico de IC, o que mostra que um tipo de açúcar agrava a doença hepática quando associada à gordura.

Eslamparast et al. (2017) [26] propuseram em uma revisão que a composição alimentar inadequada é um fator importante na progressão da DHGNA e propôs que “dieta saudável de alta qualidade” melhora a esteatose hepática e a disfunção metabólica em pacientes com DHGNA. Eles destacaram que a maioria dos pacientes com DHGNA seguem dietas com consumo excessivo de carboidratos simples e gordura total e saturada, com redução na ingestão de fibras alimentares e alimentos ricos em ômega 3.

Estudos investigando a influência da dieta no conteúdo de gordura hepática foram realizados utilizando uma dieta hipercalórica que leva a um aumento significativo no conteúdo de gordura hepática. Sabe-se que a DHC induz alguns distúrbios metabólicos, e as conseqüências são completamente dependentes da composição e duração da dieta. [32,33].

Uma visão ampla das publicações que estudam as dietas usadas para simular a DHGNA em animais mostra uma quebra nas dietas nutricionais, genéticas e combinadas. Goossens e Jornayvaz [27] descrevem os modelos nutricionais da DHGNA que tentaram mimetizar os distúrbios metabólicos observados na doença, bem como as alterações histológicas no fígado: dieta hiperlipídica, dieta deficiente em metionina e colina, dieta rica em colesterol, alta -frutose dieta, dieta cetogênica e outros modelos. Dentre essas dietas, Goossens e Jornayvaz [27] descreveram o modelo de dieta de gorduras mencionadas, testado em ratos machos Sprague-Dawley por Lieber et al. [34] (71% de energia gorda, 11% de carboidrato e 18% de proteína). Eles demonstraram o desenvolvimento de esteatose em três semanas associada à resistência à insulina e aumento dos marcadores de fibrogênese. Esse mesmo estudo também sugere que o modelo de dieta rica em frutose associado ou não ao modelo hiperlipídico induz a esteatose por um período de quatro a oito semanas. O DHC é bem conhecido por induzir alguns distúrbios metabólicos e as conseqüências são completamente dependentes da composição e duração da dieta [29].

Segundo Mikhail et al. [25], os modelos químicos são divididos em estreptozotocina, tetracloreto de carbono e dietilnitrosamina, enquanto os modelos genéticos são modelos de diabetes mellitus tipo 2 e modelos de aterosclerose e carcinoma hepatocelular.

Esses modelos permitem aos pesquisadores controlar, *in vivo*, fatores genéticos e ambientais que podem influenciar o desenvolvimento da doença e suas complicações secundárias [29], obtendo assim informações úteis sobre seu manejo e tratamento em humanos.

#### **4. Conclusão**

Em conclusão, os achados desta revisão mostram que a dieta é um dos fatores que predispõem ao aparecimento da DHGNA e que os estudos apresentaram uma grande variedade de desenhos, sendo as DHC as dietas mais frequentes com modelos experimentais de DHGNA. Reforça que os modelos de dieta animal são capazes de simular as características fisiopatológicas da DHGNA e ainda são amplamente utilizados em pesquisas, principalmente relacionadas ao teste de compostos que interferem na progressão da doença.

#### **Disponibilidade de dados**

Os dados utilizados para apoiar os resultados deste estudo estão incluídos no artigo.

#### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

#### **Referencias**

1. A. Araújo, N. Rosso, G. Bedogni and C. Tiribelli, “Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future”, *Liver International*, vol. 38, pp. 47–51, 2018.
2. R. W. Schwenk, H. Vogel and A. Schürmann, “Genetic and epigenetic control of metabolic health”, *Molecular Metabolism*, vol. 2, pp. 337–347, 2013.
3. Deng et al., “Obesity, Inflammation, and Cancer”, *Annual Review Pathology Mechanism of Disease*, vol 11, pp. 421–49, 2016.

4. Y. Fazel , A. B. Koenig, M. Sayiner, Z.D. Goodman and Z. M. Younossi, “Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease”, *Metabolism*, vol. 65, no. 8, pp. 1017-1025, 2016.
5. J. Vizuete, A. Camero, M. Malakouti, K. Garapati and J. Gutierrez, “Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview of Present and Future Therapies”, *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, vol. 5, pp. 67–75, 2017.
6. J.F. Cobbold, D.Patel, S.D.Taylor-Robinson, “Assessment of inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease by imaging-based techniques”, *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 27: pp. 1281-1292, 2012.
7. X. Dou, S. Li, L. Hu, “Glutathione disulfide sensitizes hepatocytes to TNF $\alpha$ -mediated cytotoxicity via IKK- $\beta$  S-glutathionylation: a potential mechanism underlying non-alcoholic fatty liver disease”, *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 50, no.7, 2018.
8. S. Tandra, M.M. Yeh, E. M. Brunt, *et al.* “Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease”, *Journal of Hepatology*, vol. 55, pp. 654–659, 2011.
9. N. Chalasani, Z. Younossi, J. E. Lavine *et al.*, “The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases”, *Hepatology*, no. 55, 2012.
10. L. Gerber, M. Otgonsuren, A. Mishra *et al.*, “Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol 36, pp. 772–781, 2012.
11. A. Brent and Neuschwande-Tetri, “Non-alcoholic fatty liver disease”, *BMC Medicine*, pp. 15- 45, 2017.
12. R. W. Schwenk, H. Vogel, A. Schürmann, “Genetic and epigenetic control of metabolic health”, *Molecular Metabolism*, vol.2, pp. 337–347, 2013.
13. J.K.C. Lau, X. Zhang and J. Yu, “Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances”. *The Journal of Pathology*, vol.

241, no.1, pp. 36-44, 2017.

14. S. H. Ibrahim, P. Hirsova, H. Malhi and G. J. Gores, "Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, delete, and inflame", *Digestive Diseases and Science*, vol. 61, pp. 1325–1336, 2016.

15. D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff et al. "Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement", *PLoS Med*, vol. 6, 2009.

16. Z. Ackerman, M. Oron-Herman, M. Grozovski, "Fructose-Induced Fatty Liver Disease Hepatic Effects of Blood Pressure and Plasma Triglyceride Reduction", *Hypertension*, vol. 45, pp. 1012-1018, 2005.

17. Kirsch et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: Species, strain and sex difference studies. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 18, 1272–1282, 2003.

18. T. C. Wu, L. K. Chen, S. H. Tsai, Y.H. Liaw, B. Hwanga. "Hepatic steatosis: An experimental model for quantification", *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 52, pp. 164–166, 2011.

19. G. T. Villalobos, N. H. Pérez, A.R.Tovar, et al. "Combined high-fat diet and sustained high sucrose consumption promotes NAFLD in a murine model", *Annals of hepatology*, vol. 14, no. 4, pp. 540-546, 2015.

20. J. S. Lee, D. W. Jun, E. K. Kim, H. J. Jeon, H. H. Nam, and W. K. Saeed, Histologic and Metabolic Derangement in High-Fat, High-Fructose, and Combination Diet Animal Models, *The Scientific World Journal*, vol. 2015, Article ID 306326.

21.Y. Zou, J. Li, C. Lu et al. "High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis". *Life Sciences*, vol. 79, pp. 1100 –1107, 2006.

22. S.D. McDonald, E. Pesarchuk, A. Don-Wauchope, H. E. Zimaity and A. C. Holloway. "Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight". *Nutrition Research*, vol. 31, pp. 707–71, 2011.

23. Z. J. Xu, J. G. Fan, X. D. Ding, L. Qiao and G. L. Wang, "Characterization of High-Fat, Diet-Induced, Non-alcoholic Steatohepatitis with Fibrosis in Rats". *Digestive and Diseases Sciences*, vol. 55, pp.931–940, 2010.
24. V. M. de Lima, C. P. Oliveira, V.A. Alves et al. "A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma". *Journal of Hepatology*, vol. 49, pp.1055–1061, 2008.
25. P. Solinas, M. Isola, M. A. Lilliu et al., "Animal Models Are Reliably Mimicking Human Diseases? A Morphological Study That Compares Animal with Human NAFLD", *Microscopy Research and Technique*, vol. 77, pp.790–796, 2014.
26. U. Ahmed, T. G. Redgrave and P.S Oates, "Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 24, pp.1463–1471, 2009.
27. O. Kucera and Z. Cervinkova, "Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats", *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 26, pp. 8364-8376, 2014.
28. T. Eslamparast, P. Tandon, and M. Raman. "Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease". *Nutrients*, vol. 9, 2017.
30. N. Goossens and F. R. Jornayvaz, "Translational Aspects of Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease", *Nutrients*, vol. 9, 2017.
31. A. Mikhaïl, V. Herck, L. Vonghia and S. M. Francque, "Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease- A Starter's Guide", *Nutrients*, vol. 9, 2017.
32. R. Buettner, K. G. Parhofer, M. Woenckhaus et al., "Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types". *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 6, no. 3, pp. 485–501, 2006.
33. L. Ghibaudi, J. Cook, C. Farley, M.V. Heek and J. J. HWA, "Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats", *Obesity Research*, vol.10, pp. 956–963, 2002.

34. A. Pocai, K. Morgan, C. Buettner, R. G. Juarez, S. Obici and L. Rossetti. "Central Leptin Acutely Reverses Diet-Induced Hepatic Insulin Resistance", *Diabetes*, vol. 54, no.11, pp. 3182-3189, 2005.
34. R. Buettner, J. Scholmerich and L.C. Bollheimer. "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents", *Obesity*, vol. 15, pp. 798-808, 2007.
35. N. Goossens and François R. Jornayvaz, "Translational Aspects of Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease", *Nutrients*, vol. 9, 2017.
36. C. S. Lieber, M. A Leo, K. M. Mak et al., Model of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, pp. 502–509, 2004.
37. A. Mikhaïl, V. Herck, L. Vonghia and S. M. Francque, "Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease", *A Starter's Guide. Nutrients*, vol. 9, 2017.
38. I. Lozano, R. V. der Werf, W. Bietiger et al., "High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications", *Nutrition & Metabolism*, vol. 13, no.15, 2016



## REFERÊNCIAS

ABENAVOLI L.; MILIC N.; DI RENZO L.; PREVEDEN T.; MEDIĆ-STOJANOSKA M.; DE LORENZO A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 22, p. 7006–16, 2016.

ACKERMAN Z.; ORON-HERMAN M.; GROZOVSKI M.; ROSENTHAL T.; PAPPO O.; LINK G.; SELA B. A. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. **Hypertension**, v. 45, n. 5, p. 1012-8, 2005.

ALSHAMMARI et al. Butein protects the nonalcoholic fatty liver through mitochondrial reactive oxygen species attenuation in rats. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 00, n. 00, 2018.

ALOIA, T. P. A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos Wistar (Rattus norvegicus)**. Tese (Doutorado em Anatomia dos animais domésticos e silvestres) - Universidade de São Paulo, 2006.

ANDRADE, T. A. M. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. Tese (Doutorado em ciências médicas) -Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ANSTEE Q. M.; DAY C. P. The genetics of NAFLD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 10, p. 645–55, 2013.

ASGHARI, G.; MIRMIRAN, P.; YUZBASHIAN, E.; & AZIZI, F. A systematic review of diet quality indices in relation to obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n.8, p. 1055-1065, 2017.

ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Fatty non-alcoholic diets and fatty liver disease: the good and the bad. **Clin. Nutr.** V. 33, p. 186-190, 2014.

AUBERVAL N., DAL S., BIETIGER W., et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. V. 6, p. 130, 2014.

BARRERA F., GEORGE J. The role of diet and nutritional intervention for the management of patients with NAFLD. **Clin Liver Dis.**, v. 18, p. 91–112, 2014.

BECHMANN, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **J Hepatol.**, v. 56, p. 952–964, 2012.

BELLENTANI S.; SCAGLIONI F.; MARINO M.; BEDOGNI G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Dig Dis.**; v. 28, p. 155 –161, 2010.

BOWEN, R. **Architecture of the Liver and Biliary Tract.** 2004. In: biology.about.com.

BUGIANESI E.; MOSCATIELLO S.; CIARAVELLA M. F.; MARCHESINI G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Curr Pharm Des.**, v. 16, n. 17, p. 1941–51, 2010.

BUETTNER R.; SCHOLMERICH J.; BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents Obesity. **J Mol Endocrinol.**, v. 15, p. 798-808, 2007.

BUETTNER R.; PARHOFER K. G.; WOENCKHAUS M.; WREDE C. E.; KUNZ-SCHUGHART L. A.; SCHOLMERICH J.; BOLLHEIMER L. C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol.**, v. 6, n. 3, p. 485– 501, 2006.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, v. 65, p. 1038–1048, 2016.

BRUNT E. M.; TINIAKOS D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 42, p. 5286-5296, 2010.

BRUNT E. M.; TINIAKOS D. G. Alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. In: Odze RD, Goldblum JR, editors. **Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas.** 2nd ed. Philadelphia: Elsevier, p. 1007–1014, 2009.

CAMERON A. J.; MAGLIANO D. J.; ZIMMET P. Z.; WELBORN T.; SHAW J. E. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 77, n. 3, p. 471–478, 2007.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, n. 55, 2012.

CANET M. J.; HARDWICK R. N.; LAKE A. D.; DZIERLENGA A. L.; CLARKE J. D.; CHERRINGTON N. J. Modeling Human Nonalcoholic Steatohepatitis-Associated Changes in Drug Transporter Expression Using Experimental Rodent Models. **Drug Metab Dispos**, v. 42, p. 586–595, 2014.

CHAVES L. S.; NICOLAU L. A.; SILVA R. O. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red alga *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 35, p. 93-100, 2013.

CHEN et al. Hepatocyte-specific *Gclc* deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1118–1128, 2007

CRAWFORD J. M. O fígado e o trato biliar. In: Cotran RS. Kumar V. Collins T. Robbins – Patologia Estrutural e funcional. 6ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 759-808, 2000.

PRODANOV C. C.; FREITAS E. C.; DE. **Metodologia do trabalho científico** [recurso eletrônico]: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico. 2. Ed, Novo Hamburgo: Feevale, 2013.

COELHO, L. F. **Análise morfológica do fígado e baço de camundongos Balb/c submetidos à desnutrição protéico-calórica e infectados com *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade federal de ouro preto, 2011.

DAY C. P.; JAMES O. F. Steatohepatitis:a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, V. 114, n. 4, p. 842-5, 1998.

DELLA, P. G. et al. Isocaloric Dietary Changes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Cardiometabolic Risk Individuals. **Nutrients**, v. 26, n. 9, p. 1065- 10, 2017.

DE LIMA V. M.; OLIVEIRA C. P.; ALVES V. A.; CHAMMAS M. C.; OLIVEIRA E. P.; STEFANO J. T.; DE MELLO E. S.; CERRI G. G.; CARRILHO F. J.; CALDWELL S. H.

A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v. 49, n. 6, p. 1055-61, 2008.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Elsevier, RJ, Brasil, 2004.

DOOLEY, J. et al. **Sherlock's diseases of the liver and biliary system**. 12th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.

DOU et al. Glutathione disulfide sensitizes hepatocytes to TNF $\alpha$ -mediated cytotoxicity via IKK- $\beta$  S-glutathionylation: a potential mechanism underlying non-alcoholic fatty liver disease. **Experimental & Molecular Medicine** v. 50, n. 7, 2018.

DOUGLAS CR. **Tratado de Fisiologia Aplicada a saúde**. 5<sup>a</sup> ed: Robe; 2002.

DUARTE, A. R. B. **Avaliação do fígado num modelo de toxicologia experimental com DMBA**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 2014.

DUNCAN, A. W.; DORRELL, C. & GROMPE, M. Stem cells and liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 137, p. 466–481, 2009.

DURSTINE, J. L.; GRANDJEAN, P. W.; COX, C. A.; THOMPSON, P. D. Lipids, Lipoproteins, and Exercise. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation**, v. 22, n. 6, p. 385-398, 2002.

DURSTINE, J. L.; THOMPSON P. D. Exercise in the treatment of lipid disorders. **Cardiology clinics**, v. 19, n. 3, p. 471-488, 2001.

EIPEL C.; ABSHAGEN K.; VOLLMAR B. Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. **World Journal of Gastroenterology** , v. 16, n. 48, p. 6046-6057, 2010.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). Easl-easd-easo clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v. 64, p. 1388–1402, 2016.

EROSCHENKO, V. P.; FIORE, M. S. H. DI. **DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations**. Twelfth edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2013.

FAZEL Y.; KOENIG A. B.; SAYINER M.; GOODMAN Z. D.; YOUNOSSI Z. M. Epidemiologia e história natural da doença hepática gordurosa não alcoólica. **Metabolismo**, v. 65, p. 1017-1025, 2016.

LEITE, L. M.; CARVALHO, A. G. G.; TAVARES FERREIRA, P. L. F. et al. Anti-inflammatory properties of Doxycycline and Minocycline in experimental models: An in vivo and in vitro comparative study. **Inflammopharmacology**, v. 19 n. 2, p. 99-1, 2011.

FREITAS L.; COTRIM H. **Atlas Histológico de Esteato-Hepatite Não Alcoólica - NASH**. Zambon, 2006.

FRIEDMAN S. L.; ROLL F. J.; BOYLES J.; BISSELL D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing of normal rat liver. **Proc natl acad sci usa**, v. 82, n. 24, p. 8681-5, 1985.

FRIEDMAN S. L. mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterolgy**, v. 134, n. 6, p. 1655-69, 2008.

FROMENTY B.; BERSON A.; PESSAYRE D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **J Hepatol.**, v. 26, p. 13-22, 1997.

FUJISAWA, K.; TAKAMI, T.; FUKUI, Y.; NAGATOMO, T.; SAEKI, I.; MATSUMOTO, T.; SAKAIDA, I. Assessment of high fat diet-induced fatty liver in medaka. **Biology Open**, bio.031534. 2018.

GAO, B.; JEONG, W. & TIAN, Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, v. 47, p. 729-736, 2008.

GERBER L.; OTGONSUREN M.; MISHRA A.; ESCHEIK C.; BIRERDINC A.; STEPANOVA M. et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 36, p. 772–81, 2012.

GAYOTTO, L. C. C.; VIANNA, M. R.; LEITAO, R. M. C. **Fígado e Drogas. Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Atheneu, 2001.

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GHEZZI A. C.; CAMBRI L. T.; BOTEZELLI J. D.; RIBEIRO C.; DALIA R. A.; DE MELLO M. A. Metabolic syndrome markers in Wistar rats of different ages. **Diabetol Metab Syndr.**, v. 4, n. 1, p. 16, 2012.

GHIBAUDI L.; COOK J.; FARLEY C.; VAN HEEK M.; HWA J. J. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. **Obes Res.**, v. 10, p. 956–963. 2002.

GOOSSENS, N.; JORNAYVAZ, F.R. Translational Aspects of Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 9, p. 1077, 2017.

GUTIÉRREZ-RUIZ AND GÓMEZ-QUIROZ. Liver fibrosis: searching for cell model answers. **Liver international**, v. 27, n. 4, p. 434-439, 2007.

HAN J.; DZIERLENGA A. L.; LU Z. et al. Metabolomic Profiling Distinction of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression from a Common Rat Model. **Obesity**, v. 25, n. 6, p. 1069-1076, 2017.

HERNANDEZ, G. V.; FRIEDMAN S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu ver pathol.**; v. 6, p. 425-56, 2011.

HERCK V. M.; VONGHIA L.; FRANQUE S. M. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - A Starter's Guide. **Nutrients**. V. 9, n. 10, p. 1072, 2017.

HU, XIAO-YU et al. Risk Factors and Biomarkers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Observational Cross-Sectional Population Survey. **BMJ Open**, v. 12, 2018.

IBRAHIM, S.H.; HIRSOVA, P.; MALHI, H.; GORES, G.J. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, delete, and inflame. **Dig. Dis. Sci.** v. 61, p. 1325–1336, 2016.

IIZUKA K.; BRUICK R. K.; LIANG G.; HORTON J. D.; UYEDA K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 7281–7286, 2004.

IMAJO K.; YONEDA M.; KESSOKU T. et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 1833–57, 2013.

JUMP, D. B. et al. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **The Journal of nutrition**. v. 135, p. 2503–2506, 2005.

KAKISAKA et al. Evaluation of ballooned hepatocytes as a risk factor for future progression of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Gastroenterol**, 2018.

KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox. Biol.**, v. 8, p. 216–225, 2016.

KEEFE E. B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver. **Gastroenterology**. v. 120, n. 3, p. 749-62, 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Elsevier, Rio de Janeiro, 2004.

KHAN, M. R.; KHAN, S.; SAHREEN, M.; AHMED, N. A.; SHAH, Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hyperglycemia in rat: A novel study, **Toxicol. Ind. Health**, v. 31, p. 546–553, 2015.

KLEINER DE, BRUNT EM, VAN NATTA M, ET AL. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology** 2005;41:1313-21.

KRISHAN S. Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dyslipidemia in type 2 diabetes. **Diab Met Syndr: Clin Res Ver**, v. 10, p. 77-81, 2016.

KOBYLIAK N.; ABENAVOLI L. The role of liver biopsy to assess non-alcoholic fatty liver disease. **Rev Recent Clin Trials**. V. 9, p. 159–69, 2014.

KOEK G. H.; LIEDORP P. R.; BAST A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Chim Acta**. v. 412, p. 1297-305, 2011.

KUCERA O.; CERVINKOVA Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**: WJG. 2014;20(26):8364-8376.

KULKARNI, N. M et al. A novel animal model of metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease and skin inflammation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1110–1117, 2014.

LAU J. K. C.; ZHANG X, Y. U J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **The Journal of Pathology**. v. 241, n. 1, p. 36-44. 2017.

LEE J. S.; JUN D. W.; KIM E. K.; JEON H. J.; NAM H. H.; SAEED W. K. Histologic and Metabolic Derangement in High-Fat, High-Fructose, and Combination Diet Animal Models. **The Scientific World Journal**, 2015.

LIEBER, C. S.; LEO, M. A.; MAK, K. M.; XU, Y.; CAO, Q.; REN, C.; PONOMARENKO, A.; DECARLI, L.M. Model of nonalcoholic steatohepatitis. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p. 502–509, 2004.

LY, F.; WU, J.; MIAO, D.; AN, W.; AND WANG, Y. Deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis via regulation of hepatic oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 486, p. 264–269, 2017.

LOUREIRO-SILVA MR, MOLINA HM, BORGES DR. Substâncias vasoativas e a modulação do sistema microvascular hepático. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 45, p. 206-216, 1999.

LOZANO et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, n.15, 2016.

MACHADO M.; MARQUES-VIDAL P.; CORTEZ-PINTO H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. **J hepatol.**, v. 45, p. 600–606, 2013.

MARCHESINI G.; BUGIANESI E.; FORLANI G.; CERRELLI F.; LENZI M.; MANINI R.; NATALE S. et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, p. 917-23, 2003.

MASARONE M.; FEDERICO A.; ABENAVOLI L.; LOGUERCIO C.; PERSICO M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. **Rev Recent Clin Trials**. V. 9, p. 126–33, 2014.



MCCARTHY, E. M., & RINELLA, M. E. The Role of Diet and Nutrient Composition in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n.3, p. 401–409, 2012.

MCDONALD S. D.; PESARCHUK E.; DON-WAUCHOPE A.; ZIMAITY HE AND HOLLOWAY AC. “Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight”. **Nutrition Research**, v. 31, p. 707–71, 2011.

MIKOLASEVIC, I. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a new factor that interplays between inflammation, malnutrition, and atherosclerosis in elderly hemodialysis patients. **Clin. Interv. Aging.**, v. 9, p. 1295–1303, 2014.

MOHER D, A.; LIBERATI, J.; TETZLAFF et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Med**, v. 6, 2009.

NAGLE C. A.; KLETT E. L.; COLEMAN R. A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. **J lipid res.** v. 50, p. 74-9, 2009.

NASCIMBENI F.; PAIS R.; BELLENTANI S.; DAY C. P.; RATZIU V.; LORIA P. et al. From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. **J hepatol.** v. 59, p.859–71, 2013.

NEMETH, E.; BAIRD, A.W. & O’FARRELLY, C. Microanatomy of the liver immune system. **Semin Immunopathol**, v. 31, p. 333–343, 2009.

NEUMAN M. G.; COHEN L. B.; NANAU R. M. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. **Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology.** v. 28, n.11, p. 607-618, 2014.

NOUREDDIN, M. D. AND ROHIT, L. Nonalcoholic fatty liver disease: indications for liver biopsy and noninvasive biomarkers mazen. **Clin. Liver Dis.** v. 1, p. 25–38, 2012.

NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. **Fisiologia hepática.** Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2007. Disponível em: <<http://www.doencasdofigado.com.br/fisiologia%20hepatica.pdf>>. Acesso em: 08/05/2018.

OLIVEIRA C. P.; MAZO D. F. C. Doença hepática gordurosa não alcoólica: fisiopatogênica e relação com a terapêutica. In: Parise E. R.; Mendonça Filho H. T. F. **Esteatose hepática: visão hepatologia e cardiometabólica**. São Paulo: Arte de Viver, MTS editora, p. 25-33, 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Estratégia regional e plano de ação para um enfoque integrado da prevenção e controle das doenças crônicas**. Washington: OPAS; 2007.

ORTIZ T. H. **Efeito da taurina sobre a esteatose hepática induzida por tioacetamida em Danio rerio**. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

PARRY S. A.; HODSON L. Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism. **J Investig Med**, v. 0, p. 1–14, 2017.

PALMA L. C. **Doença Esteatótica não alcoólica do fígado: comparação das alterações histológicas hepáticas entre modelo murinho e pacientes obesos**. [dissertação de mestrado]. Bahia: Universidade Federal da Bahia; 2012.

POCAI A.; MORGAN K.; BUETTNER C.; JUAREZ R. G.; OBICI S. AND ROSSETTI L. Central Leptin Acutely Reverses Diet-Induced Hepatic Insulin Resistance, **Diabetes**, v. 54, n.11, p. 3182-3189, 2005.

POLIMENI L, et al. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. **World J Hepatol**. v. 7, n.10, p. 1325–36, 2015.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Lipid metabolism and liver inflammation. II. fatty liver disease and fatty acid oxidation. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 5, p. G852-G858, 2006.

RILEY N. E.; LI J.; MCPHAUL L. W.; BARDAG-GORCE F.; LUE Y. H.; FRENCH S. W. Heat shock proteins are present in Mallory bodies (cytokeratin aggregates) in human liver biopsy specimens. **Exp Mol. Pathol**. v. 74, p. 168-72, 2003.

RODRIGUES, GRAZIELLA RAMOS. **Ação da sinvastatina no modelo experimental de Esteato-Hepatite não alcoólica**. [dissertação de doutorado] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radic. Biol. Med.** v.52, p. 59–69, 2012.

ROSAS-VILLEGAS, A.; SÁNCHEZ-TAPIA, M.; AVILA-NAVA, A.; RAMÍREZ, V.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress. **Nutrients**, v. 9, p. 393, 2017.

TOMOFUJI T.; EKUNI D.; YAMANAKA R. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **J Periodontol**, v. 78, p. 1999-2006, 2007.

TORRES-VILALOBOS G. et al. Combined high-fat diet and sustained high sucrose consumption promotes NAFLD in a murine model. **Ann Hepatol.** v. 14, n. 4, p. 540-6, 2015.

SANTOS R.; COTRIM H. Relevância das medidas antropométricas na avaliação de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica. **Rev Bras Nutr Clin.** v. 21, p. 229-32, 2006.

SATTAR N.; FORREST E.; PREISS D. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMJ**, v. 349, p. 4596, 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SILVA, A. H. **Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos saudáveis.** Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SILVA G. H.; ESCANHOELA C. A. F. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 18, n. 5/6, p. 269-279, 2009.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. Alcohol and the Liver. In: Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System. 11ª ed. **Oxford Blackwell Science**, 381-98, 2002.

SHIRALI, A. C.; GOLDSTEIN, D. R. Tracking the toll of kidney disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.19, p. 1444–1450, 2008.

STEFANICK M. L.; MACKEY S.; SHEEHAN M.; ELLSWORTH N.; HASSEL W. L.; WOOD P. D. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. **N Engl J Med.** v. 339, n. 1, p. 12-20, 1998.

NATASHA A. S.; JENNIFER L. K. Exercise and the fatty liver. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 33, p. 802-807, 2008.

SOLINAS P.; ISOLA M.; LILLIU M. A.; CONTI G.; CIVOLANI A.; DEMELIA L.; LOY F.; ISOLA R. Animal models are reliably mimicking human diseases? A morphological study that compares animal with human NAFLD. **Microsc Res Tech.** v. 77, n. 10, p. 790-6, 2014.

SOLER G. L. N.; SILVA A. W. S. M.; SILVA V. C. G.; TEIXEIRA R. J. Doença hepática gordurosa não-alcóolica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. **Rev Socerj**, v. 2, p. 94-100, 2008.

STSNAD P.; STUMPTENER C.; ZATLOUKAL K.; DENK H. Intermediate filament cytoskeleton of the liver in health and disease. **Histochem Cel Biol.** v. 129, p. 735-49, 2008.

TAKAKI, A.; KAWAI, D.; YAMAMOTO, K. Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Int. J. Mol. Sci.** v. 14, p. 20704 –20728, 2013.

TANDRA S.; YEH M. M.; BRUNT E. M. et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol.** v. 55, p. 654–659, 2011.

TANNAZ E.; PUNEETA T.; MAITREYI R. Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 9, p. 800, 2017.

TETRI L. H.; BASARANOGLU M.; BRUNT E. M.; YERIAN L. M.; NEUSCHWANDER-TETRI B. A. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed

trans fats and a high-fructose corn syrup equivalente. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 295, p. G987-G995, 2008.

TOSHIMITSU K.; MATSUURA B.; OHKUBO I.; NIIYA T.; FURUKAWA S.; HIASA Y.; KAWAMURA M.; EBIHARA K.; ONJI M. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. **Nutrition**, v. 23, p.46-52, 2007.

THULIN P, et al. PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 231, p. 1–9, 2008.

TURLIN B.; RAMM G. A.; PURDIE D. M.; et al. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. **Liver International**, v. 29, p. 530-535, 2009.

UCHIYAMA M.; MIHARA M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Ana Biochem**. v.86, p. 271–278, 1978.

VASCONCELOS et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS D. F. P.; SILVA F. R. P.; PINTO M.E. S.C. et al. Decrease of Pericytes is Associated With Ligature-Induced Periodontitis Liver Disease in Rats. **J Periodontol**, 2017, v.88, p. 49-57.

VERNON G.; BARANOVA A.; YOUNOSSI Z. M. Sistematic Review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 34, p. 274-285, 2011.

VIEIRA, B. M. **Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

VU, L. T. et al. The hepatocyte proteome in organotypic rat liver models and the influence of the local microenvironment. **Proteome Science**, v. 15, n. 1, p. 12, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chronic diseases and their common risk factors**. Geneva: WHO; 2005.

WU, L. LI, T.; WEN, Y.Q. LI. Protective effects of echinacoside on carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, **Toxicol.** v. 232, p. 50–56, 2007.

WU T. C.; CHEN L. K.; TSAI S. H.; LIAW Y. H.; HWANG B. Hepatic steatosis: an experimental model for quantification. **Arch Gerontol Geriatr.** v. 52, n. 2, p. 164-6, 2011.

XU, ZHENG-JIE et al. Characterization of High-Fat, Diet-Induced, Non-Alcoholic Steatohepatitis with Fibrosis in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 4, p. 931–940, 2010.

YAMAGUCHI K.; YANG L.; MCCALL, S.; HUANG J.; YU X. X.; PANDEY S. K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**. v. 45, n. 6, p. 1366-74, 2007.

YESILOVA Z. et al. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Gastroenterol.** v. 100, n. 4, p. 850–5, 2005.

YULONG W. U. et al. Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate highfat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation. **Biomac**, 2018.

ZAMMIT V. A. Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. **Biochemical Journal.** v. 314, p. 1-14, 1996.

ZARZOUR R. H. A.; AHMAD M.; ASMAWI M. Z. et al. Phyllanthus niruri standardized extract alleviates the progression of non-alcoholic fatty liver disease, **Nutrients**, v. 9, p. 766, 2017..

ZHENG et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, p. 55–60, 2012.

ZHENG et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, 2015.

ZOU Y.; LI J.; LU C.; WANG J.; GE J.; HUANG Y.; ZHANG L.; WANG Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Life Sci.** v. 79, n. 11, p. 1100-7.

## **ANEXOS**



## ANEXO I - Termo de aprovação do comitê de ética em experimentação animal.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734\_e-mail: ceapi@ufpi.edu.br

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos para esteatose causada pela periodontite induzida em animais**", registrada nº 385/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS do Departamento de Biomedicina\_ Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **08/09/2017**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/2018 à Janeiro/ 2022
Espécie/Linhagem/raça	Rato isogênico/ wistar
Nº de Animais	70
Peso/ Idade	200g/ 12 sem.
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 08 de Setembro de 2017.

  
Prof<sup>a</sup>. Ivetete L. de Mendonça  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

## ANEXO II – Carta de aceite da Revista

Yarah Elmadany <yarah.elmadany@hindawi.com>

Qua 31/10/2018, 22:16

Você ▾



Dear Dr. Rodrigues,

I am pleased to let you know that your article has been published in its final form in "International Journal of Hepatology."

Ayane A. Rodrigues, "Relationship between Experimental Diet in Rats and Nonalcoholic Hepatic Disease: Review of Literature," International Journal of Hepatology, vol. 2018, Article ID 9023027, 8 pages, 2018.  
<https://doi.org/10.1155/2018/9023027>.

You can access this article from the Table of Contents of Volume 2018, which is located at the following link:

<https://www.hindawi.com/journals/ijh/contents/>

Alternatively, you can access your article directly at the following location:

<https://www.hindawi.com/journals/ijh/2018/9023027/>

"International Journal of Hepatology" is an open access journal, meaning that the full-text of all published articles is made freely available on the journal's website with no subscription or registration barriers.

If you would like to order reprints of this article please get in touch with our dedicated reprints team for a quote at [reprints@hindawi.com](mailto:reprints@hindawi.com).

Best regards,

Yarah Elmadany  
International Journal of Hepatology