

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular  
Departamento de Morfologia

Karen Marques de Oliveira Costa

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA  
NO PERÍODO PÓS-NATAL**

Belo Horizonte

2021

Karen Marques de Oliveira Costa

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA  
NO PERÍODO PÓS-NATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Belo Horizonte

2021

043

Costa, Karen Marques de Oliveira.

Caracterização morfológica do acúmulo de gordura hepática no período pós-natal [manuscrito] / Karen Marques de Oliveira Costa. – 2021.

45 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fígado. 3. Recém-nascido. 4. Gotículas lipídicas. I. Menezes, Gustavo Batista de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

<b>ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE</b>	<b>347/2021</b>
<b>KAREN MARQUES DE OLIVEIRA COSTA</b>	<b>ENTRADA</b>
	<b>1º/2019</b>
	<b>2019690173</b>

Às **dez horas** do dia **24 de agosto de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA NO PERÍODO PÓS-NATAL**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Gustavo Batista de Menezes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

<b>Prof./Pesq.</b>	<b>Instituição</b>	<b>Indicação</b>
Dr. Gustavo Batista de Menezes	UFMG	Aprovada
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	Aprovada
Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 24 de agosto de 2021.**

Dr. Gustavo Batista de Menezes (Orientador)

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 05/11/2021, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 08/11/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Mattos Jardim Costa, Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2021, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1061817** e o código CRC **97543DD0**.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ser refúgio, força e paz nos momentos de incerteza e por ser amigo nos momentos de alegria. Agradeço à toda minha família, que mesmo de maneira indireta foi a base para que eu chegasse até aqui. Em especial, agradeço à minha mãe, Tânia, por ser meu maior exemplo de força e determinação, e aos meus irmãos, Adriana, Junior, Amanda, Ariane, Caio, Aline e Leonardo por sempre acreditarem e me encorajarem a fazer aquilo que eu achava ser o certo. Sendo bem clichê e verdadeira, saibam que essa conquista não seria possível se eu não tivesse cada um de vocês. Minhas sobrinhas e sobrinho pela paciência nos momentos em que eu não podia brincar e assistir filmes por estar ocupada ou por precisar ir ao laboratório aos finais de semana.

Iniciando os agradecimentos aos amigos, não poderia não colocar no topo um amigo/irmão que foi o responsável por eu entrar no CGB, Gabriel Campolina. Não tenho palavras para agradecer por ter se arriscado por mim, e por ser minha inspiração diária. Sou grata por aprender com você dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do CGB, que me acolheram desde o começo e me ensinaram tudo o que eu precisava aprender. À Cris, que chegou depois e em pouco tempo me ensinou tanto. À Ari, por ser a primeira pessoa a me pegar pela mão, e ensinar como ser organizada e dedicada. Maísa por ser porto seguro em dias de experimento e sabedoria em todos os outros. Kassi, Brenda, Gabi e Mateus pelas conversas e experimentos. Horts pelos ensinamentos, brincadeiras e trocas sobre dados inéditos, à Maluzinha por toda sabedoria e leveza, à Camilinha por ter sido tão especial nessa fase final do mestrado, pelo socorro nos experimentos, pela firmeza, e pelos segredos compartilhados. Ao meu amigão, Gabriel Alvim, por adentrar as madrugadas em chamadas de vídeo me ajudando a enxergar beleza e valor onde eu não via, e por ter se tornado um presente da pós. Em especial, gostaria de agradecer a melhor dupla de prova de mestrado, seminários, estágio didático e cafés no ICB, Maria Alice, a pureza em forma de pessoa e a sorte grande em forma de amiga. Obrigada por segurar minha mão em literalmente todos os momentos da pós-graduação. Saiba que tudo o que construímos aqui, será pra sempre. VAI DAR CERTO!!

Aos amigos da faculdade que estavam por perto desde o começo. Aos amigos da vida, que estão ao meu lado desde sempre (e espero que para

sempre), acreditando em mim mais do que eu mesma. Não vou citar todos os nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém, mas não posso deixar de mencionar, Maurício, Matheus, Déborah, Laynara, Lara e Marcos. Obrigada, eu amo MUITO vocês.

E por fim, mas não menos importante, meu orientador Gustavo Menezes, por me receber em seu laboratório sem me conhecer e me ensinar tantas coisas, sobre ser uma boa profissional e principalmente como ser um ser humano que faz a diferença na vida das pessoas, assim como você fez na minha. Serei eternamente grata pelos ensinamentos e pelos momentos de descontração.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e todos os professores que o integram, inclusive a banca.

A agência de fomento CAPES por tornar possível a realização deste trabalho.

Ser pesquisador no Brasil é um trabalho árduo, mas saibam que a caminhada vale a pena quando cada um de vocês faz parte da jornada. Por isso, muito obrigada por existirem. Amo Vocês!

“Cientistas são contadores de histórias.”

*Richard Feynman*



## **Resumo**

O fígado é um órgão fundamental para a homeostase do organismo. Sua importância tem gênese no período gestacional quando o órgão assume o controle de um processo crucial, a hematopoiese do feto. O desenvolvimento neonatal é plástico e o fígado está constantemente experimentando uma rápida proliferação celular, tornando-o sensível aos desafios ambientais, como por exemplo, produtos bacterianos advindos da microbiota intestinal e metabólitos da dieta, que nesta fase da vida é exclusivamente o leite materno. Composto por um repertório celular diversificado, o ambiente hepático, sustenta funções vitais para um funcionamento harmônico ao longo da vida do indivíduo. No início da vida, a única fonte de alimentação é o leite, é dele que toda energia necessária para o desenvolvimento é retirada. Abrigando todo o conteúdo primordial para que o desenvolvimento dos mamíferos ocorra perfeitamente, o leite materno conta com a presença de anticorpos, proteínas, carboidratos, e principalmente água e gordura. Neste projeto, vimos que o fígado de camundongos no período pós-natal é repleto de gordura, estoque este que decai ao longo da vida, tendo a maior queda no período de desmame do animal. Em um contexto onde a gordura evolutivamente está em órgãos e processos vitais para a sobrevivência, se faz necessária a elucidação da dinâmica gordurosa hepática no período pós-natal, bem como a participação do aleitamento no processo de deposição de gordura no fígado. Assim, é importante entender por quê o fígado, um órgão sumariamente descrito como metabólico, pode ser um alicerce para a evolução de um indivíduo saudável.

**Palavras-chave:** Fígado. Recém-nascido. Gotículas Lipídicas

## **Abstract**

The liver is fundamental for the homeostasis of the organism. Its importance has its origin in the gestational period when the organ assumes the control of a crucial process: the hematopoiesis of the fetus. The neonatal development is plastic and the liver is constantly under cellular proliferation, making it sensitive to the environmental challenges, for example bacterial products of the intestinal microbiota and metabolites from the diet, which in this phase is, exclusively, breast milk. Composed of a diverse cellular repertoire, the hepatic environment supports vital functions throughout the individual's life. In the first periods *postpartum* milk is the only source of energy and nutrients, acting as the key substrate for healthy growth. Sheltering the whole primordial dietetic engineering - so that the perfect development of the mammals takes place, breast milk has antibodies, carbohydrates, and mainly water and fat. In this project, we observed that mice liver has higher quantities is full of lipid droplets in the postnatal period. The fat stock declines till the animal reaches adulthood, having the most substantial decrease in the weaning period. Considering that fat has been part of human diet during its evolution, being vital for their survival, it is necessary to elucidate the hepatic fat dynamics during the postnatal period, as well as the role of breast-feeding in the process of fat deposition in the liver. Therefore, it is important to understand why the liver, widely described as a metabolic organ, may be a foundation for the evolution of a healthy individual.

**Keywords:** Liver. Newborn. Lipid Droplets

## **Lista de ilustrações e figuras**

<b>Ilustração 1</b> – Localização e composição da gotícula lipídica	17
<b>Ilustração 2</b> – Localização da enzima DGAT1	18
<b>Ilustração 3</b> – Via biológica da síntese de triglicerídeos	19
<b>Figura 1</b> – Histologia hepática	27
<b>Figura 2</b> – Calibração da visualização de gotículas lipídicas através de Bodipy	29
<b>Figura 3</b> – Dinâmica da gordura hepática ao longo da vida	31
<b>Figura 4</b> – Quando a gordura é observada no fígado animal	33
<b>Figura 5</b> – A fonte da gordura hepática	35
<b>Figura 6</b> – Dinâmica da deposição de gordura – Do embrião à vida adulta	36
<b>Figura 7</b> – Redução da gordura hepática por iDGAT	38-39
<b>Figura 8</b> – Método de depleção de gordura hepática	40

## Lista de Abreviações

**AG-CoA**- Ácido Graxo Coenzima A

**AGPAT** – Acilglicerol 3-Fosfato Acil-Transferase

**ALT** – Alanina Aminotransferase

**CEUA** – Comitê de ética no uso de animais

**DGAT**- Diacilglicerol-Acil-Transferase

**DHGNA** – Doença Hepática Gordurosa Não Alcólica

**DMSO** – Dimetil sulfóxido

**FFA** – Ácidos graxos livres

**GPAT** – Glicerol Fosfato Acil-Transferase

**HFD** – High Fat Diet

**iDGAT** – inibidor da Diacilglicerol-Acil-Transferase

**I.v** – Intravenoso

**NASH** – Esteato-Hepatite Não Alcólica

**NPCs** – Células não parenquimais

**MGAT** – Monoacilglicerol Acil-Transferase

**pH** – Potencial hidrogeniônico

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>11</b>
1.1- Fígado- Estrutura e heterogeneidade .....	11
1.2- Estrutura do lóbulo hepático.....	12
1.3- O fígado ao longo da vida .....	13
1.4- Gotículas Lipídicas .....	15
1.5- Formação e composição das gotículas lipídicas .....	18
1.6- Implicações do acúmulo de gordura.....	20
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
3.1 - Objetivo geral.....	22
3.2 - Objetivos específicos .....	22
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>23</b>
4.1 - Animais experimentais .....	23
4.2 - Microscopia Confocal.....	23
4.3 - Análise de imagens.....	23
4.4 - Modelo de depleção por iDGAT .....	24
4.5 - Ensaio de Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT).....	24
4.6 - Análises Estatísticas .....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 – Histologia hepática .....	26
5.2 - Calibração da visualização de gotículas lipídicas através de Bodipy.....	28
5.3 - Dinâmica da gordura hepática ao longo da vida .....	30
5.4 – Quando a gordura é observada no fígado animal .....	32
5.5 – A fonte da gordura hepática .....	34
5.6 - Dinâmica da deposição de gordura – Do embrião à vida adulta.....	36

5.7 – Método de depleção de gordura hepática .....	37
<b>6. Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Considerações Finais.....</b>	<b>44</b>
Referências bibliográficas .....	11

## **1. Introdução**

### **1.1- Fígado- Estrutura e heterogeneidade**

O fígado é a maior glândula e segundo maior órgão do corpo, podendo compreender 2% do peso corporal em humanos e 5% em camundongos (Dancygier, 2010). Situado na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, o fígado é revestido pelo peritônio em quase toda sua superfície, formando uma camada delgada denominada cápsula de Glisson que se espessa no hilo, local por onde entram os vasos sanguíneos e saem os ductos biliares e linfáticos (Vollmar and Menger, 2009). O fígado, é um órgão extremamente vascularizado, possuindo fluxo sanguíneo de aproximadamente 1,8 litros de sangue por minuto. Este órgão apresenta aporte sanguíneo duplo, recebendo sangue venoso (pobre em oxigênio e rico em nutrientes) e sangue arterial (rico em oxigênio) (Dancygier, 2010). Cerca de 80% do sangue que chega ao fígado é venoso e oriundo da drenagem do intestino e alguns órgãos viscerais, a irrigação arterial é feita pela artéria hepática e compreende cerca de 20% do aporte sanguíneo hepático (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Dado isso, o fígado opera na interface entre o trato gastrointestinal e a circulação sistêmica, servindo como uma espécie de filtro, patrulhando e retirando do sangue venoso tudo o que é nocivo e não proveitoso antes de devolvê-lo ao coração (Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019).

O fígado desempenha dezenas de funções conhecidas e já descritas, dentre elas o metabolismo de macronutrientes, homeostase da glicemia, colesterol e lipídeos (Klip & Vranic, 2006; Rui, 2014). Em adição, o fígado é crucial para os processos de detoxificação de compostos nocivos ao organismo e metabolismo de drogas, possuindo ainda uma grande participação na homeostase do corpo pela liberação de hormônios pela porção endócrina (Malespin & Nassri, 2019). Além do supracitado, o fígado é um importante local de produção de proteínas circulantes como a albumina e fatores de coagulação, e contribui, ainda, com a função imunológica sintetizando as proteínas de fase aguda do sistema complemento (Gebhardt, 1992).

A heterogeneidade hepática não se restringe apenas a funcionalidade, sua composição celular, procedente de diferentes origens embriológicas, compõe a diversidade do microambiente do fígado, de modo que cada uma das células

apresenta funções particulares e trabalham em sincronia para um funcionamento hepático harmônico. A principal célula que compõe o fígado é o hepatócito, célula parenquimal hepática, que constitui cerca de 80% da massa do órgão e corresponde a aproximadamente 60% do total de células do fígado (Godoy *et al.*, 2013). Contudo, o fígado abriga uma grande diversidade de células não parenquimais (NPC's) dentre elas, colangiócitos que revestem os ductos biliares, células endoteliais, células estreladas, células de Kupffer e outras células imunes que dão suporte às atividades dos hepatócitos. Todas essas células que compõe o fígado não estão organizadas de maneira uniforme, elas estão dispostas em unidades anatômicas denominadas lóbulo hepático.

### **1.2- Estrutura do lóbulo hepático**

Também conhecidos como, unidades funcionais do fígado, os lóbulos são estruturas poligonais que se encaixam lateralmente umas às outras em todas as camadas do fígado, são delimitados por uma camada delgada de tecido conjuntivo oriunda da cápsula de Glisson. Na extremidade de cada um dos seus vértices estão as tríades portais, compostas pela veia porta, artéria hepática e um ducto biliar, estruturas responsáveis pela irrigação sanguínea e drenagem biliar respectivamente. No centro de cada lóbulo encontra-se a veia centrolobular recebendo todo o sangue que fluiu através do fígado levando-o até a veia cava inferior. O circuito sanguíneo do fígado conta com uma extensa rede de capilares sinusóides fenestrados (ramificações da veia porta e artéria hepática) que submete as células circundantes uma alta superfície de contato com o sangue recém chegado ao órgão. O sangue então, flui da periferia do lóbulo hepático em direção a veia centrolobular. Os hepatócitos estão dispostos radialmente, em formato de cordão, dentro dos lóbulos hepáticos e convergem ao centro dessa estrutura em direção a veia centrolobular. Devido a essa conformação e pela presença das janelas sinusoidais os hepatócitos são expostos a diferentes concentrações de nutrientes, oxigênio e metabólitos, de modo que as células próximas a periferia (periportais) lidam primeiro com todo o conteúdo do sangue e, de modo decrescente, as células a jusante (pericentrais) são submetidas a menores gradientes de oxigênio, nutrientes e metabólitos (DeLeve, 2013; Ben-Moshe and Itzkovitz, 2019). Os hepatócitos são células especializadas e responsáveis pela maioria das funções metabólicas do fígado incluindo produção e excreção de



lipoproteínas, e armazenamento de gordura (Racanelli and Rehermann, 2006; Treyer and Müsch, 2013).

### **1.3- O fígado ao longo da vida**

O fígado é um órgão chave para realização de diversos processos vitais para o organismo durante todo o processo de desenvolvimento. Sua plasticidade tem início no período fetal, onde, é responsável pela hematopoiese do feto. No adulto, a produção de células sanguíneas, é governada por células multipotentes chamadas de células tronco hematopoiéticas (HSC's), com capacidade de auto renovação a fim de manter sua própria linhagem, além disso são capazes de se diferenciar em todas as demais células sanguíneas, primeiro dando origem aos precursores que após diferenciação se tornam maduros e podem finalmente ser liberados na circulação. Um adulto saudável produz cerca de  $10^{12}$  células por dia na medula óssea sendo que parte dessas células são liberadas na corrente sanguínea. Em contraste, no período fetal a geração de HSC's e o estabelecimento da hematopoiese ocorrem em diferentes locais dentro dos tecidos fetais, começando pelo saco vitelínico, aorta-gônada-mesonefros, placenta e, finalmente o fígado fetal (Johnson & Moore, 1975; Orkin & Zon, 2008; Sitayeb, Lemaigre & Duncan, 2010; Ober & Lemaigre, 2018; Mafra *et al.*, 2019). Apesar de alguns estudos demonstrarem que animais recém-nascidos podem, ainda, possuir algum resquício hematopoiético hepático (Greter, Hofmann & Beter, 2009), após o nascimento a medula óssea assume a produção de células sanguíneas mantendo o suprimento celular até a vida adulta (Sugiyama *et al.*, 2011; Lucas, 2017; Popescu, *et al.*, 2019).

Por outro lado, o ambiente hepático na vida adulta não participa da hematopoiese, mas sim atua em uma vertente metabólica, sendo responsável pela detoxificação de metabólitos nocivos, balanço energético e promoção da homeostase lipídica por meio de vias bioquímicas e sinalização celular estritamente reguladas (Alves-Bezerra & Cohen, 2017). O antagonismo funcional de um mesmo órgão, porém em momentos distintos da vida, sugerem que existe um período de transição necessário para que tais características sejam desenvolvidas.

Entre o período fetal e a vida adulta, está o período pós-natal marcado por drásticas mudanças na vida do animal. De uma forma geral, todos os tecidos e órgãos passam a lidar com uma infinidade de novas informações advindas de diversas fontes. O fígado, por sua vez, é relativamente imaturo e precisa passar por um período de

maturação e diferenciação que, mais tarde, vão garantir sua capacidade funcional (Grijalva & Vakili, 2013; Moreno-Carranza, *et al.*, 2018). Logo após o nascimento, o fígado passa por dois grandes desafios fisiológicos: i) A alteração na circulação sanguínea que, anteriormente era desviada do fígado pela ligação do ducto venoso com a veia umbilical e veia cava, e no período pós-natal, quando a comunicação materna é interrompida, parte do sangue advindo do débito cardíaco e da drenagem dos órgãos viscerais passam pelo fígado, ii) concomitantemente, o intestino é colonizado por bactérias provenientes da amamentação, com isso, o sangue drenado deste órgão chega ao fígado trazendo consigo uma infinidade de nutrientes e metabólitos novos capazes de auxiliar e moldar o funcionamento hepático (Beath, 2003).

Como mostrado no trabalho desenvolvido por nosso grupo, o fígado de um animal recém-nascido é integralmente distinto de um fígado adulto, desde a composição celular que, no início é predominantemente de origem mielóide, com alguns precursores hematopoiéticos, poucos hepatócitos, baixa expressão de genes ligados ao metabolismo de carboidratos e lipídeos e rede vascular com circularidade maior que no animal adulto, que por sua vez possui um fígado com a massa de hepatócitos bem estabelecida, raras células de origem mielóide, presença mais expressiva de células linfóides e rede vascular mais linear que os recém-nascidos (Nakagaki, *et al.*, 2018).

A vida fora do útero submete o recém-nascido a uma série de desafios ambientais. No decorrer desta fase, o recém-nascido lida, ainda, com mudanças na disponibilidade de nutrientes, visto que, intraútero, a nutrição era ininterrupta e após o nascimento não só o intervalo de alimentação muda, mas também a fonte, neste momento o leite materno é o responsável por prover todo o necessário para o desenvolvimento e chegada até a vida adulta.

O leite materno é composto por anticorpos, proteínas, carboidratos, e principalmente água e lipídeos, sendo colocado como item chave para o desenvolvimento de um indivíduo saudável na vida adulta, uma vez que, crianças que recebem fórmulas, em substituição ao leite materno, são apontadas como mais propensas a desenvolver distúrbios intestinais e metabólicos, sugerindo que o conteúdo nutricional do leite materno é insubstituível (IP, *et al.*, 2007; Chong, *et al.*, 2011; Izumi, *et al.*, 2014). Os desafios nutricionais pós-natais, são apenas um vértice

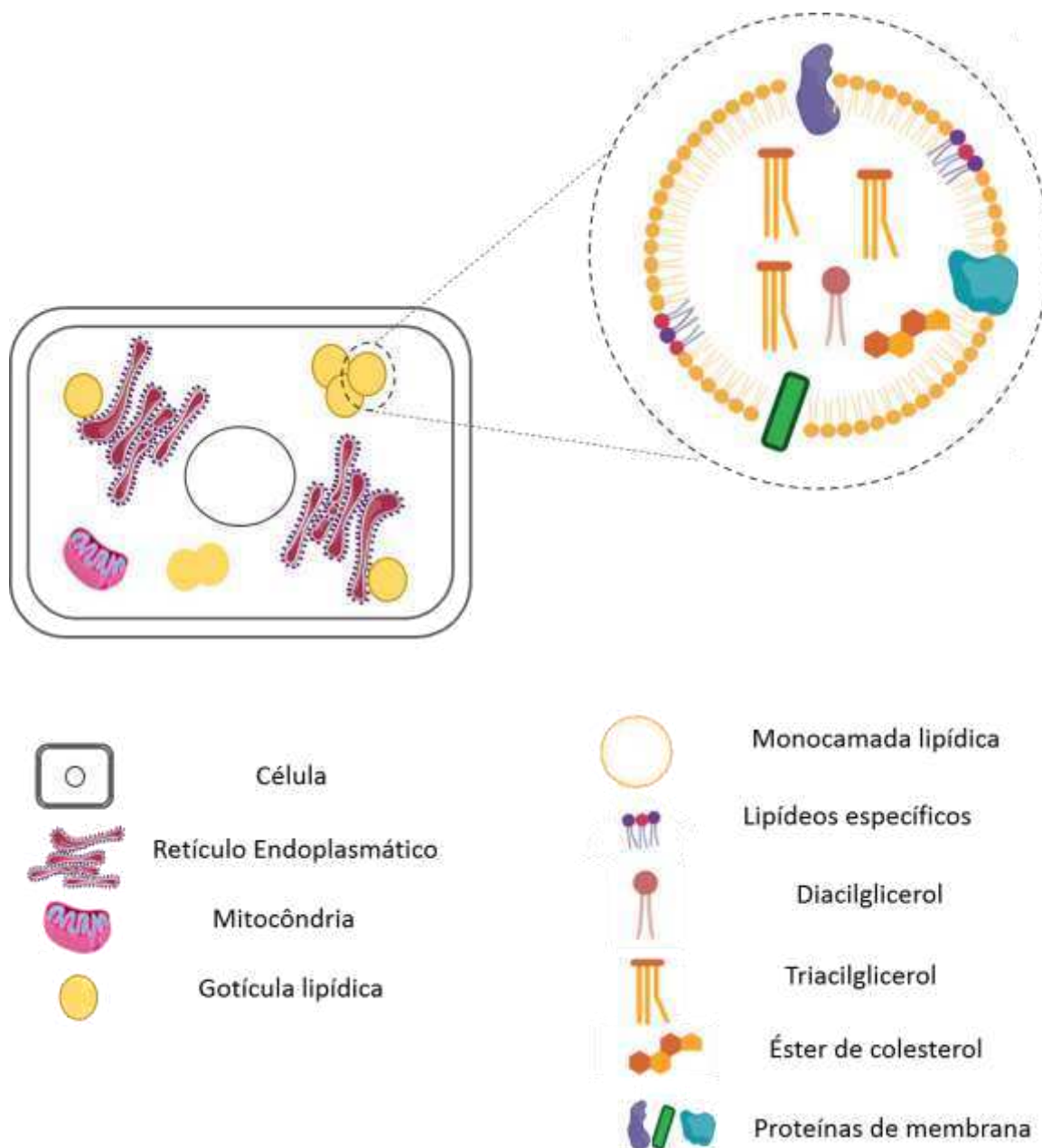
de toda uma maquinaria ainda em processo de funcionamento ótimo, mas certamente, compõem a base para a homeostase nessa fase da vida.

A alimentação é, sabidamente, um processo capaz de modular diversas funções no organismo, principalmente no fígado, uma vez que todo o conteúdo digerido passa por esse órgão antes de ser redistribuído aos demais tecidos, e em alguns casos, parte desse conteúdo pode ser armazenado no próprio fígado, como é o caso dos ácidos graxos (AG) (Paglialunga & Dehn, 2016). AG são uma das classes de biomoléculas que em suas mais diversas formas e combinações dão origem e participam de quase todos os processos fisiológicos do corpo desde a composição da bicamada das membranas celulares até a sinalização celular propriamente dita (Pereira-Dutra et al., 2019). Além de estar presente nesses processos, os AG podem ser encontrados na medula óssea, músculo esquelético, cérebro, em grandes quantidades nos adipócitos e em gotículas lipídicas no interior das células (Zweytick, Athenstaedt, Daum, 2000; Hamrick, McGee-Lawrence, Frechete, 2016; Chianese et al., 2018).

#### 1.4- Gotículas Lipídicas

As gotículas lipídicas foram inicialmente descritas como partes inertes do citoplasma celular, com um único objetivo: armazenar o excesso de ácidos graxos provenientes da circulação na forma de triglicerídeos para posteriormente serem utilizados na geração de energia (Zweytic, Athenstaedt & Daum, 2000; Tauchi-Sato, et al., 2002). Em seguida, Listenberger e colegas relataram que a formação de gotículas lipídicas protegia as células pancreáticas da lipotoxicidade causada por ácidos graxos não esterificados. O interesse acerca da funcionalidade dessas organelas cresceu substancialmente e as descobertas envolvendo cada parte e componente das gotículas lipídicas são objetos atuais de estudo (Jarc & Petan, 2019, 2020; Bosch, Parton & Pol, 2020). Hoje, sabe-se que as gotículas nunca foram inertes, são organelas dinâmicas e multifuncionais, compostas por um núcleo de lipídios neutros (diacilglicerol, triglicerídeo e ésteres de colesterol), rodeados por uma monocamada fosfolipídica e uma gama de proteínas de membrana (**Ilustração 1**) (Bozza, et al., 2011; Walther & Farese Jr., 2012). Presentes em quase todos os tipos celulares em diversos organismos vivos como, plantas, bactérias e leveduras, as gotículas já foram descritas por participarem ativamente da fisiologia e fisiopatologia

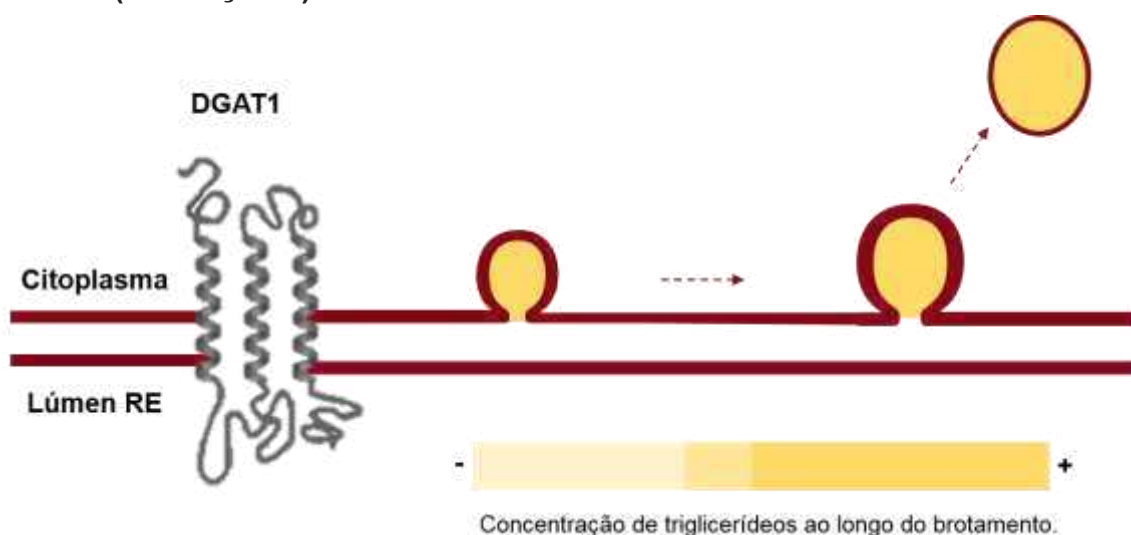
das respostas celulares, metabolismo lipídico, tráfego de membranas e produção de mediadores inflamatórios (Christiansen & Jensen, 1972; Tzen & Huang, 1992; Liu *et al.*, 2004; Murphy, 2012; Cruz, *et al.*, 2020). Em cada célula, as gotículas lipídicas apresentam composições distintas e, essas características, na maioria das vezes, auxiliam nas respostas à estímulos aos quais as células são continuamente submetidas. Juntos, esses achados evidenciam o protagonismo dessas organelas, inicialmente negligenciadas e que por muito tempo não receberam a atenção devida. O aparecimento de tecnologias e métodos capazes de auxiliar na elucidação do papel das organelas permite que as gotículas lipídicas sejam cada vez mais exploradas e desvendadas (Bozza, *et al.*, 2011; Pereira-Dutra *et al.*, 2019).



**Ilustração 1: Composição da gotícula lipídica.** As gotículas são compostas majoritariamente por triglicerídeos, em menor quantidade encontra-se diglicerídeos e ésteres de colesterol. A composição proteica da monocamada pode variar conforme o tecido.

### 1.5- Formação e composição das gotículas lipídicas

A biogênese das gotículas aborda um acúmulo inicial de lipídeos entre os folhetos da membrana do retículo endoplasmático de forma que o excesso dessas moléculas dá origem a uma protuberância na membrana (Blanchette-Mackie, 1995) e, o crescimento da gotícula se dá pela nucleação, majoritária, de triglicerídeos e, em menor quantidade, ésteres de colesterol seguida do brotamento para o citoplasma celular (Fujimoto *et al.*, 2004; Bozza, Magalhães & Weller, 2009; Gluchowski, 2019). A enzima DGAT, é protagonista na formação dessas organelas, visto que, está disposta membrana do retículo endoplasmático, apresentando dois domínios funcionais, sendo um deles voltado para o lúmen do retículo e outro para o citoplasma da célula (**Ilustração 2**).

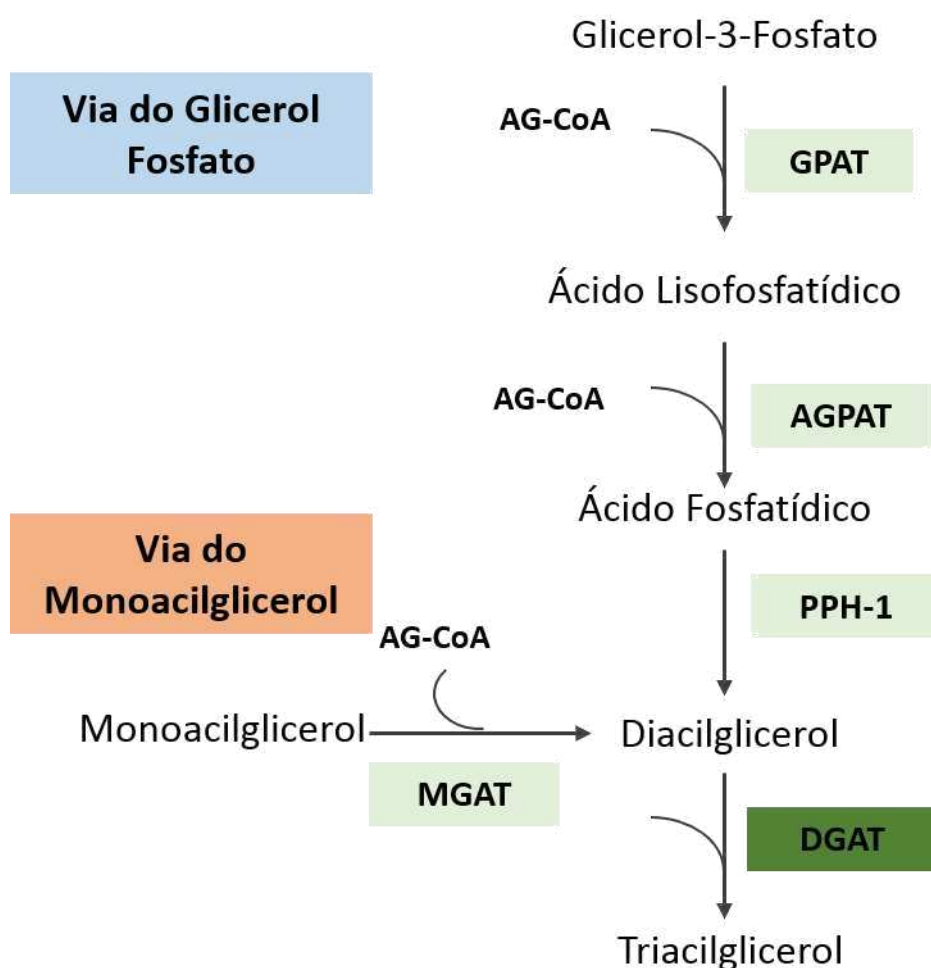


**Ilustração 2: Localização da enzima DGAT1.** A DGAT1 (Diacilglicero-acil-transferase-1) é uma proteína transmembranar localizada na bicamada lipídica do Retículo Endoplasmático.

O triglicerídeo, principal componente das gotículas lipídicas, é produto da junção de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol por meio de ligações do tipo éster. Obtido principalmente por meio da dieta, os triglicerídeos são hidrolisados e digeridos ao longo do trato gastrointestinal, por ação das lipases, lingual, gástrica e pancreática. Sua digestão, dá origem a outras moléculas que podem atuar como intermediárias para sua formação, o monoacilglicerol e diacilglicerol, compostos por um e dois ácidos graxos ligados a um glicerol, respectivamente e a ácidos graxos livres (FFA). No duodeno, mais especificamente, nos enterócitos, os FFA's, mono e diacilgliceróis, podem ser reesterificados no lúmen do retículo endoplasmático e incorporados a gotículas de gordura que, com a adição de proteínas de membrana

dão origem ao quilomícron, lipoproteína encarregada de estabilizar e carrear os lipídeos na circulação linfática até o fígado. A **Ilustração 3**, exemplifica duas vias pelas quais obtêm-se o triglicerídeo como produto final.

Durante o trajeto, o quilomícron sofre ação da lipase lipoproteica, enzima



**Ilustração 3: Via biológica da síntese de triglicerídeos.** O esquema mostra a participação da DGAT na última etapa de formação do triglicerídeo, principal componente das gotículas lipídicas. Adaptado de Chen and Farese V Jr. 2013

associada à superfície das células endoteliais, e tem parte do seu conteúdo hidrolisado, os ácidos graxos livres, vão para os tecidos periféricos. No entanto, nos sinusóides hepáticos essa enzima não está presente, sendo assim, o quilomícron, que agora passa a se chamar quilomícron remanescente, interage com receptores de apolipoproteínas, presentes na membrana dos hepatócitos, e é então endocitado

(Getz & Reardon, 2018). O conteúdo lipídico recém chegado é então direcionado para seguir o caminho de produção de VLDL (Lipoproteína de densidade muito baixa), lipoproteína que conduz os lipídeos aos tecidos periféricos, e parte do conteúdo é usado na geração de energia e formação de gotículas lipídicas (Nguyen, *et al.*, 2008). O aumento na ingestão de dietas com alto teor lipídico pode prejudicar a homeostase desses processos culminando em um desbalanço na produção de VLDL e formação de gotículas de gordura em tecidos periféricos (Cohen; Horton & Hobbs, 2011; Fazel, *et al.*, 2016).

### **1.6- Implicações do acúmulo de gordura**

O acúmulo de gordura em tecidos não adiposos, é majoritariamente associado a quadros de doenças como diabetes tipo 2, aterosclerose, obesidade e esteatose hepática, em suas mais diversas classificações. Essas patologias podem ser desencadeadas por fatores genéticos e epigenéticos, sendo o consumo de alimentos ricos em lipídeos um fator notável (Choquet & Meyre, 2011; Ali, 2013).

Um estudo do nosso grupo revelou os distúrbios precoces da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), mostrando que, o consumo, prolongado ou não, de dietas com alto teor lipídico (HFD) pode levar ao acúmulo de gordura no ambiente hepático de camundongos, alterando o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, de carboidratos, e ainda, genes ligados à fagocitose de patógenos, predispondo os animais à disfunções e deixando-os susceptíveis à infecções, além disso, o acúmulo de gordura no fígado pode alterar a composição imune-hepática (Diniz, *et al.*, 2020). As informações trazidas por esse estudo revelam o quanto os lipídeos, moléculas importantes para a sobrevivência dos mamíferos, são capazes de modular o microambiente hepático. Outro estudo, também do nosso grupo, utilizou HFD, porém, provenientes de diversas fontes, e mostrou que de modo semelhante, todo o ambiente hepático foi alterado, desde o claro e acentuado acúmulo de gordura até a expressão gênica (Antunes, *et al.*, 2021). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que não só o tempo de consumo importa, mas que, diferentes tipos de lipídeos podem imprimir no fígado, diferentes efeitos imunes e metabólicos.



## 2. Justificativa

Embora se saiba como ocorre o desenvolvimento hepático no período gestacional, ainda é pouco explorado como os desafios neonatais impactam no desenvolvimento do fígado de camundongos recém-nascidos. A cronologia do desenvolvimento hepático descrita por Nakagaki e colaboradores abre portas para o entendimento e elucidação de como o fígado, um órgão sumariamente descrito como metabólico, pode ser um alicerce para a evolução de um indivíduo saudável (Nakagaki, et al., 2018).

Sabendo que a alimentação influencia o microambiente hepático, muitos trabalhos elucidaram os impactos prejudiciais do acúmulo de gordura no fígado, bem como o desenvolvimento de desordens como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em suas mais diversas evoluções, mas até o presente momento nenhum estudo foi publicado com o olhar voltado para a alimentação em um contexto fisiológico neonatal. Até mesmo os estudos voltados à primeira fase da vida (em humanos), referem-se a esteatose pediátrica como consequência de desordens herdadas geneticamente ou secundárias a malformações (Beath, 2003). Diante disso, é de suma importância avaliar todo o contexto de mudanças na dieta ao longo da vida, começando pelo período pós-natal, quando a alimentação enteral é introduzida na vida do animal através da amamentação.

Seguindo essa vertente, o presente trabalho busca caracterizar o acúmulo de gordura hepática no período neonatal, bem como estabelecer até quando esse fenômeno persiste. Diante disso, o que justifica a realização deste trabalho é entender se o acúmulo de gordura, que geralmente está associada a patologias metabólicas, pode estar relacionado com o desenvolvimento saudável do indivíduo.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Caracterizar o acúmulo de gordura hepática no período pós-natal.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

- Demonstrar, por meio de microscopia intravital, a localização da gordura hepática em camundongos recém-nascidos.
- Observar a arquitetura e composição hepática frente à depleção de gordura;

## **4. Metodologia**

### **4.1 - Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 provenientes do centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG). Durante o período de experimentação, os animais foram alojados em microisoladores de polipropileno Alesco® no biotério do Centro de Biologia Gastrointestinal. Os animais tiveram livre acesso à água e ração, temperatura e umidade foram controladas com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram mantidos com os progenitores até o momento dos testes ou até a data do desmame (21 dias). Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o número 315/2017.

### **4.2 - Microscopia Confocal**

A microscopia confocal foi realizada conforme descrito previamente por (Marques et al., 2015). Resumidamente, os animais receberam, por via intravenosa, uma mistura de anticorpos, contendo anti-CD31 conjugado com o polímero BD Horizon Brilliant™ Violet com emissão em 421 nanômetros (BV421) (2µg/Kg, Becton Dickinson, BD, clone 390), anti-F4/80 conjugado com ficoeritrina (PE) (2µg/Kg, Becton Dickinson, BD, clone T452342). Os anticorpos foram diluídos em salina estéril em um volume total de 0,02ml para animais de até sete dias, e 0,05ml para as demais idades. Após 30 minutos, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina e Xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil. 60mg/Kg e 15mg/Kg, respectivamente) e laparatomizados na linha média para exposição do fígado. Feito isso, uma solução de Bodipy (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boron, 1mg/ml, diluído em DMSO) foi depositada diretamente sob o fígado (1µg/por animal). As imagens foram adquiridas em um microscópio confocal Nikon Eclipse Ti A1R equipado com detector espectral (Nikon Shinagawa, Tokyo, Japan).

### **4.3 - Análise de imagens**

As imagens foram analisadas de forma semiautomática utilizando o algoritmo do software NIS Elements 5.1 (Nikon). A área de gordura foi calculada em relação a área total da imagem. A análise morfológica das gotículas inclui perímetro e área

individual de cada objeto considerado. Essa análise foi realizada digitalmente pelo algoritmo do software NIS Elements 5.1 (Nikon). Para quantificação das células de Kupffer, foi utilizado o software Volocity (6.3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

#### **4.4 - Modelo de depleção por iDGAT**

Animais com 14 dias de vida foram submetidos ao protocolo de depleção. O inibidor de DGAT (iDGAT) (A922500 – Sigma Aldrich) foi diluído em DMSO e, no momento do experimento, foi administrado com salina estéril por via oral (3mg/Kg, volume final de 50µl/por gavagem) de 12/12 horas durante sete dias. O grupo controle recebeu, também por via oral, uma solução de salina estéril juntamente com DMSO na mesma proporção do grupo tratado. Os animais foram pesados todos os dias durante a realização do experimento, pois as doses precisam ser ajustadas de acordo com o peso diário. Os animais foram mantidos na caixa com os progenitores durante esse período. Ao fim do tratamento os animais foram eutanasiados e foram coletadas as amostras necessárias para análises.

#### **4.5 - Ensaio de Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT)**

Uma possível lesão hepática foi investigada, de forma indireta, através dos níveis séricos da enzima Alanina Aminotransferase. Para isso foi realizado um teste cinético (Bioclin). Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas a 15.000 RPM por 10 minutos para coleta do soro. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços sem a necessidade de diluições. Junto com o substrato (Tampão Tris pH 7,8, LDH, L-alanina, NaCl e azida sódica) e coenzimas (alfacetoglutarato, NADH e azida sódica) ambos fornecidos pelo fabricante. A placa contendo as amostras foi mantida a 37° por 50 segundos e, então foi lida num espectrofotômetro (340nm) a 37° em intervalos de um minuto durante quatro minutos.

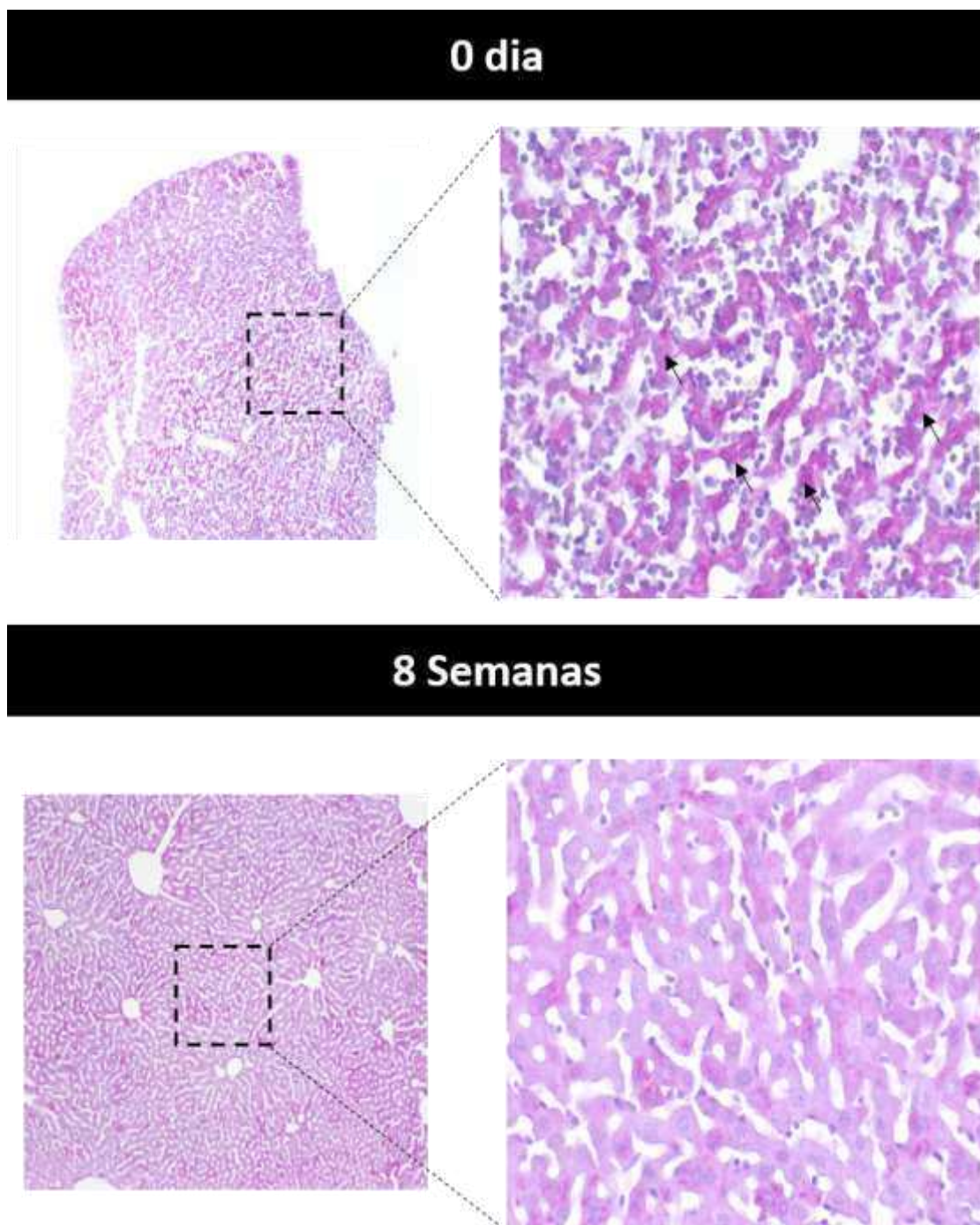
#### **4.6 - Análises Estatísticas**

A análise estatística dos dados, bem como a criação dos gráficos foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad software, Inc). Os valores foram expressos  $\pm$  EPM (erro padrão da média), e dois grupos foram considerados estatisticamente significativos quando  $P \leq 0,005$ . O teste estatístico utilizado nesse estudo foi o Teste T de Student.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 – Histologia hepática

Nosso primeiro passo foi observar como era a deposição de gordura através da coloração histológica por hematoxilina e eosina. Na **Figura 1**, estão dispostas as imagens de um animal no dia do seu nascimento (dia 0) e um animal adulto (8 semanas). Nota-se que a estrutura e organização dos órgãos é bem distinta. No animal recém-nascido os cordões de hepatócitos não estão completamente definidos, o que é observado no animal adulto. No parênquima hepático podem ser observados espaços negativos nos hepatócitos, sugerindo a presença de gotículas de gordura (setas pretas). Embora seja possível observar a presença dessas organelas no citoplasma celular, a organização hepática do recém-nascido dificulta uma visualização clara. Já nos animais adultos saudáveis, não foi possível identificar a presença de gordura, sugerindo que as gotículas, se existentes, podem ser muito pequenas a ponto de o método não ser capaz de evidenciar.

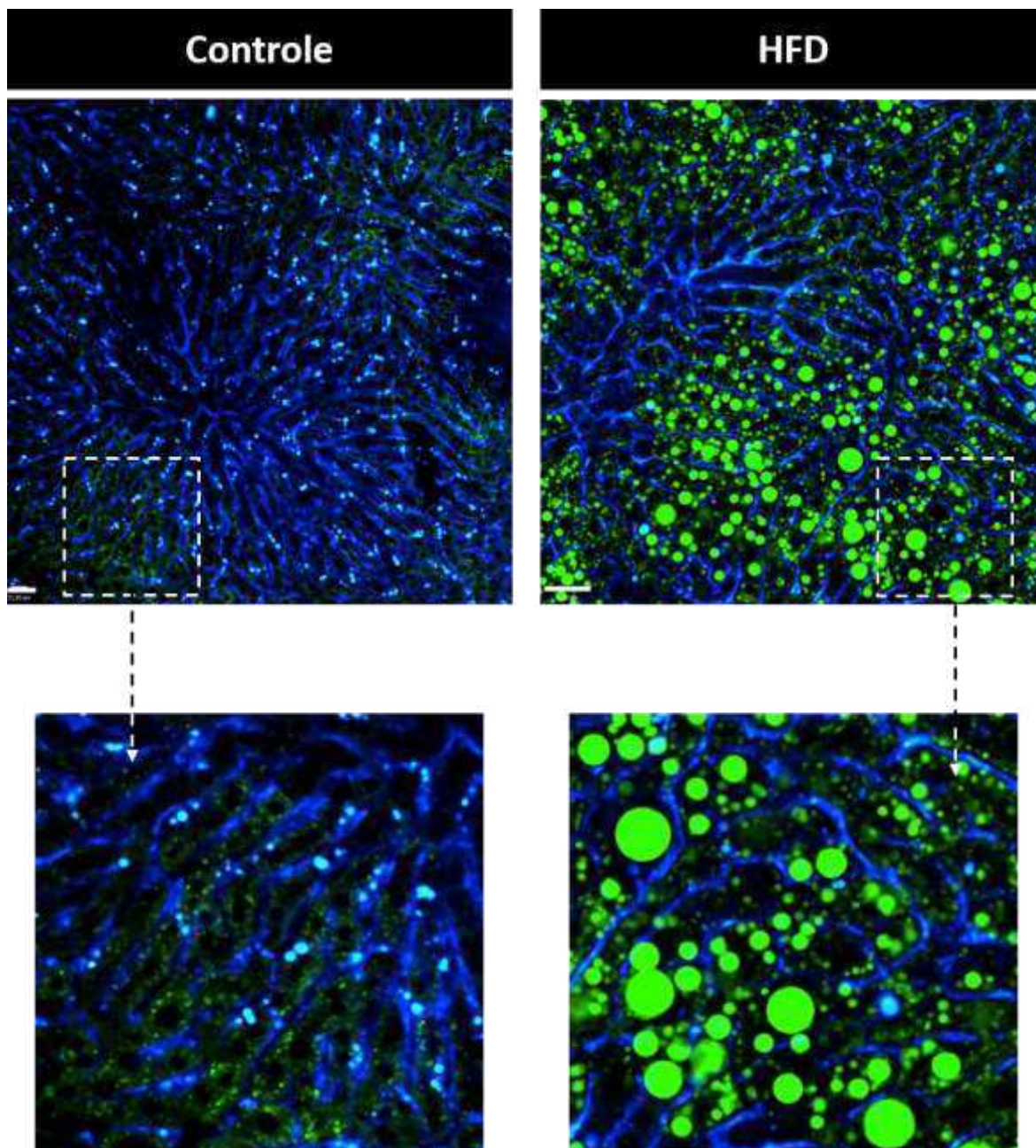


**Figura 1: Histologia hepática.** Nota-se que, somente raras gotículas podem ser observadas no parênquima do fígado do animal com 0 dia (setas pretas).

## 5.2 - Calibração da visualização de gotículas lipídicas através de Bodipy

Buscando investigar um pouco mais afundo, utilizamos um método já estabelecido em nosso grupo de pesquisa, de visualização de gotículas de gordura por meio de microscopia intravital, na qual foi utilizado um corante de lipídeos neutros, chamado Bodipy. Sabendo que animais que ingerem dietas com alto teor lipídico (HFD) apresentam deposição de gordura acentuada no parênquima hepático, utilizamos esse perfil como nosso controle positivo e um animal que ingeriu dieta padrão como animal controle. Pôde ser observado no animal controle (**Figura 2**), pequenas gotículas de gordura em algumas áreas do parênquima hepático, o oposto do observado na histologia. Já no animal alimentado com HFD, grandes gotículas puderam ser observadas (**Figura 2**). Em conjunto, esses dados sugerem que o Bodipy é um método mais sensível e claro (se comparado a coloração por Hematoxilina e Eosina), no que tange a deposição de gordura hepática, e que para esse trabalho seria de maior valia, dado que pequenas quantidades de gordura foram detectadas por esse método (animal controle) assim, a visualização da gordura no período pós-natal seria mais fidedigna.

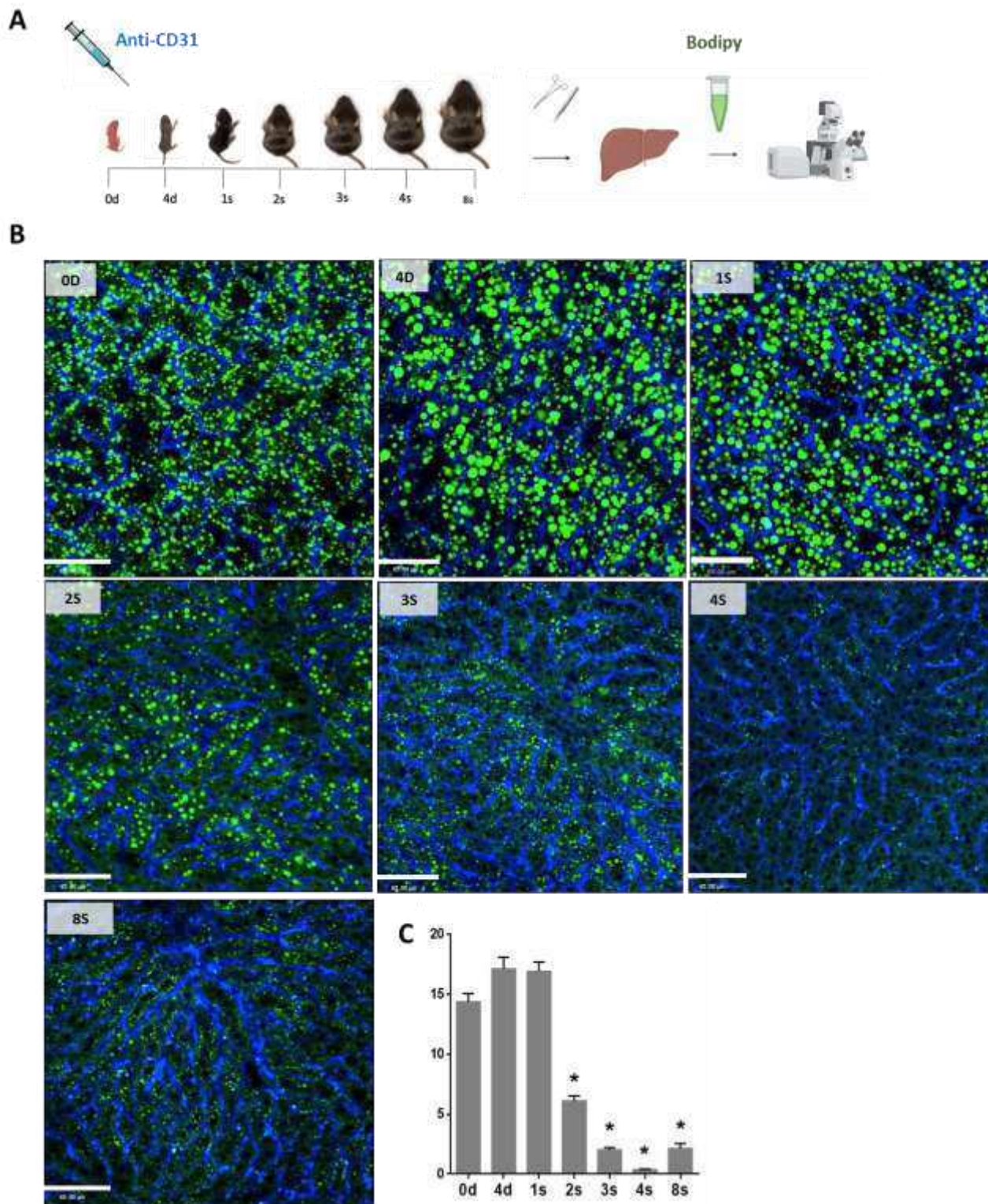




**Figura 2: Calibração da visualização de gotículas lipídicas através de Bodipy.** A coloração com Bodipy permite uma melhor visualização de gotículas lipídicas em animais controle (não visualizadas na histologia) e alimentados com dietas ricas em lipídeos (verde, corante fluorescente, Bodipy, 1mg/ml, 10 µl por

### 5.3 - Dinâmica da gordura hepática ao longo da vida

Uma vez estabelecido o método, nosso próximo passo, foi estabelecer a dinâmica do acúmulo de gordura no fígado do modo mais fisiológico possível. Para isso, marcamos a vasculatura hepática com anti-CD31 BV421 (200µg/kg), para visualizar as gotículas de gordura utilizamos Bodipy (1µg/animal) (**Figura 3A**), aliados à microscopia confocal. Surpreendentemente, animais de zero dia e oito semanas de vida, apresentaram perfis de deposição de gordura opostos, sendo que o fígado de animais recém-nascidos mostrou um maior acúmulo de gordura que os animais adultos (**Figura 3B**). Dentro desse espectro, outras idades foram analisadas, animais com quatro dias e animais com uma semana apresentaram o maior acúmulo de gordura se comparados aos animais com zero dia e ainda maior se comparados aos animais de oito semanas (**Figura 3B**), já os grupos com duas, três e quatro semanas, mostraram queda dos níveis de gordura hepática aproximando dos níveis de um animal adulto com oito semanas (**Figura 3C**).

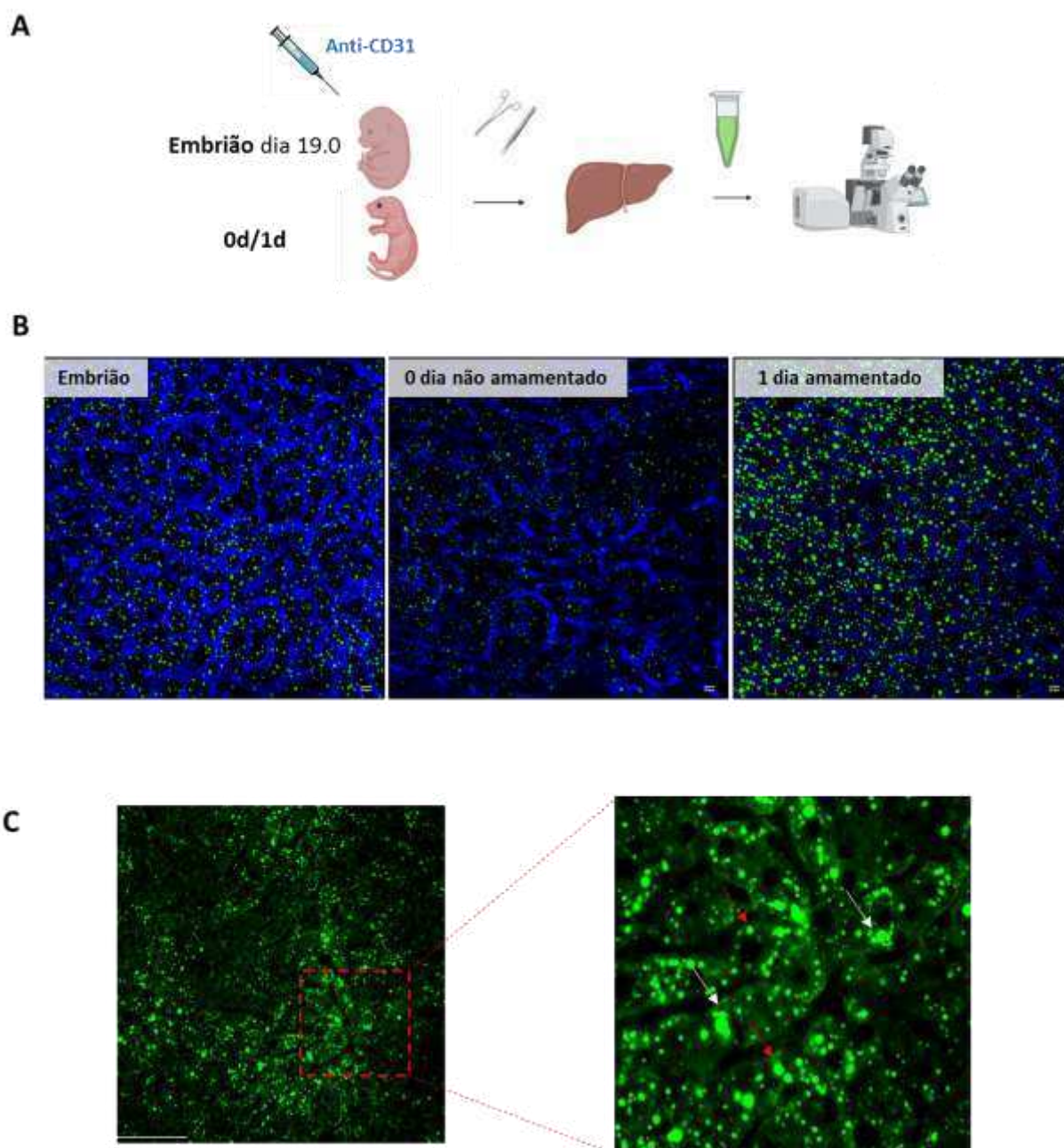


**Figura 3: Dinâmica do acúmulo de gordura após o nascimento: (A)** Representação esquemática do delineamento experimental. **(B)** IVM evidenciando a deposição de gotículas lipídicas (verde, corante fluorescente, Bodipy, 1mg/ml, 1µg/por animal) no parênquima hepático, e sinusóides hepáticos (em azul, anti-CD31 conjugado com BV421, clone 390, 200 µg/Kg, i.v). Objetiva de 20X; barra= 65µm. **(C)** Quantificação da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem (média de 5 campos por animal, n≥5). Resultados exibidos como média ± SEM. \*p<0,05 se comparado com o controle.

#### 5.4– Quando a gordura é observada no fígado animal

Considerando o padrão de deposição lipídica dos animais recém-nascidos, e observando que já no dia do nascimento esses animais apresentavam uma grande área de deposição, nos perguntamos se o animal já nasce com as gotículas de gordura. Dessa forma, um embrião no dia E19.0 foi submetido aos mesmos procedimentos de marcação com anticorpo e Bodipy (CD31 BV421 -200µg/kg e Bodipy -1µg/animal) (**Figura 4A**). Quando analisado, foram visualizadas pequenas gotículas de gordura. Ainda nessa vertente, animais logo após o nascimento e antes mesmo de amamentarem passaram pelo mesmo processo e exibiram perfil semelhante (**Figura 4B**). Diante disso, não foi observada diferença na quantidade de gordura entre esses animais, o contraste foi observado apenas após um dia de amamentação, direcionando nossa atenção à um dos primeiros desafios da vida pós-natal que é a introdução alimentar. (**Figura 4B**).

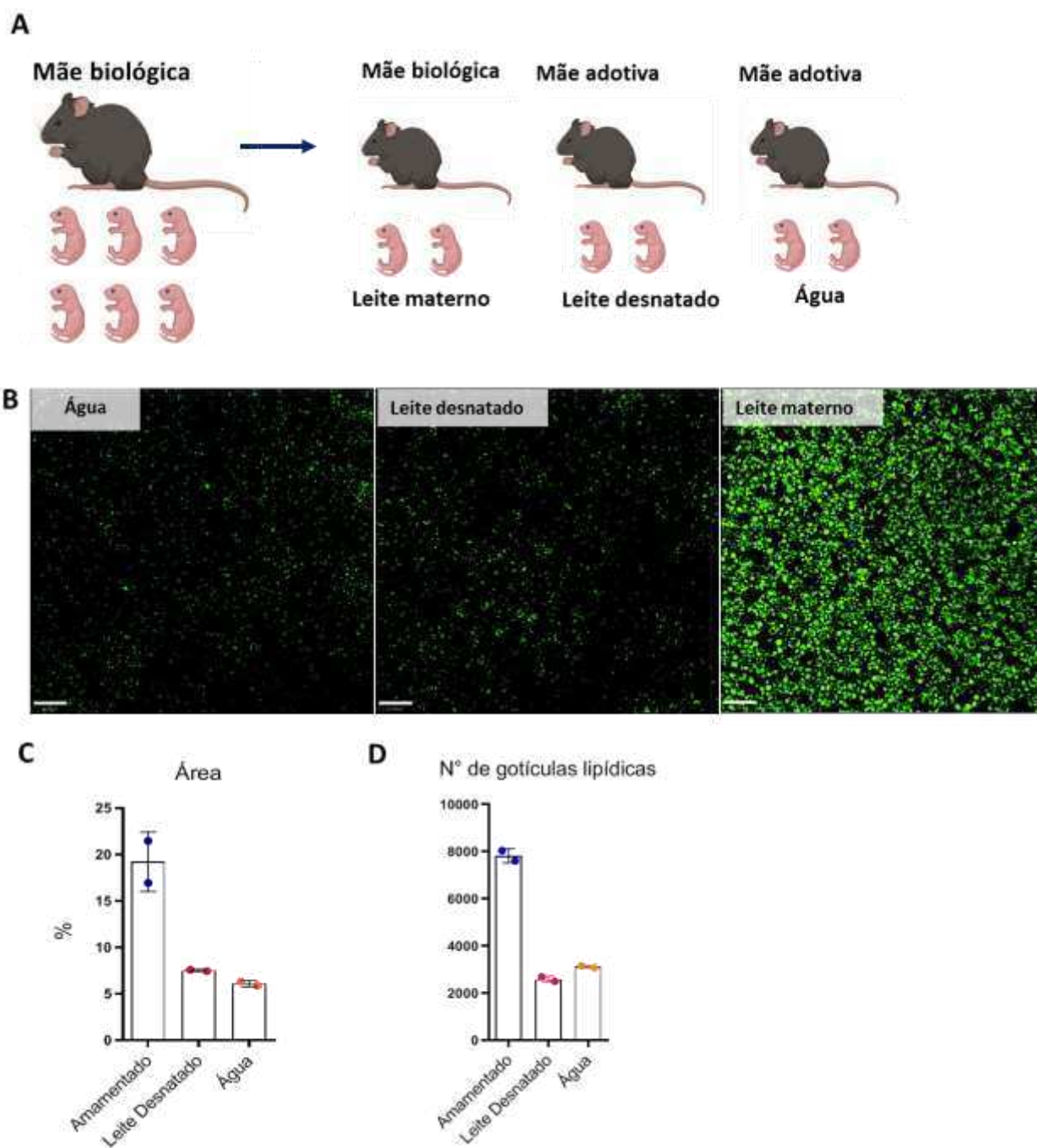
Sabendo que o fígado é composto por diversos tipos celulares e que algumas dessas células são responsáveis por armazenar gordura, como as células de Ito e hepatócitos em algumas condições, buscamos evidenciar onde, em nosso modelo, a gordura estava armazenada. A **Figura 4C**, mostra as gotículas de gordura dispersas no citoplasma de hepatócitos, podem ser visualizadas gotículas individuais (setas vermelhas) ou *clusters* (setas brancas). Em nosso modelo, fica clara a deposição dessas organelas dentro dos hepatócitos e não em espaços sinusoidais.



**Figura 4: O animal não nasce com acúmulo de gordura no fígado:** (A) Representação esquemática do delineamento experimental. (B) IVM mostrando presença de pequenas gotículas lipídicas antes e logo após o nascimento (antes da amamentação) e um dia após a ingestão do leite materno (verde, corante fluorescente, Bodipy, 1mg/ml, 10  $\mu$ l por amostra), e sinusóides hepáticos (em azul, anti-CD31 conjugado com BV421, clone 390, 200  $\mu$ g/Kg, i.v). (C) Imagem obtida por microscopia confocal na objetiva de 20X com zoom de 2x, mostrando que as gotículas estão dentro dos hepatócitos. É possível observar a presença de gotículas separadas (setas vermelhas) e aglomerados (setas brancas).

### 5.5– A fonte da gordura hepática

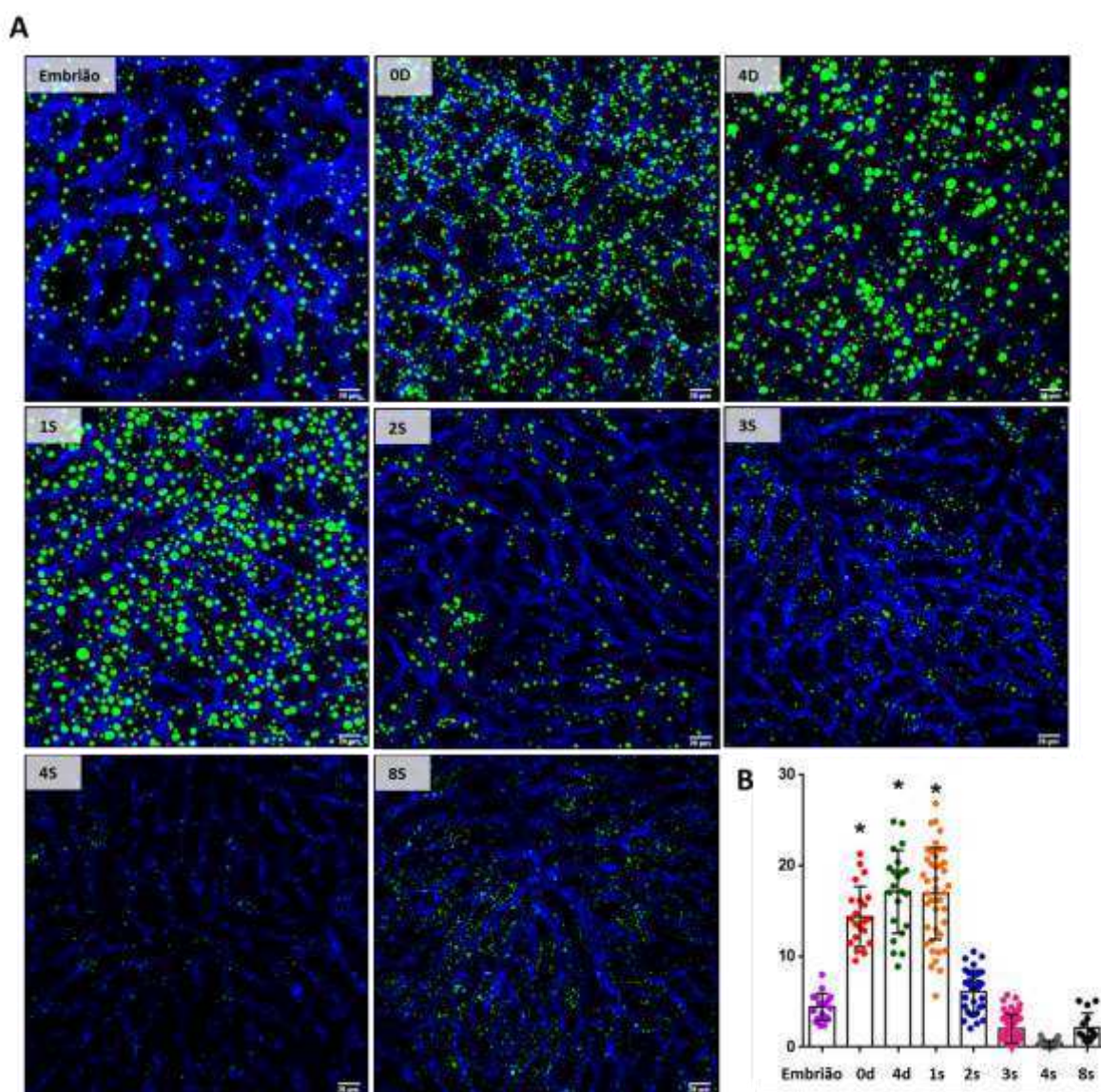
Nas primeiras semanas de vida do animal, sua única fonte de alimentação é o leite materno, composto por uma quantidade considerável de gordura (Faulcounier et al., 2019). Considerando que, é nessa fase da vida que o fígado detém a maior quantidade de gordura, nos perguntamos se não seria essa a fonte desse macronutriente. Para responder essa pergunta, uma fêmea grávida foi monitorada até que seus filhotes nascessem, antes mesmo que eles pudessem amamentar pela primeira vez, foram separados e deixados com mães adotivas que nunca pariram, isso para não correrem o risco de produzirem leite e amamentarem os filhotes adotivos, mas para realizarem toda a parte de fornecimento de calor e contato, ainda, um grupo permaneceu com a mãe biológica (**Figura 5A**). Durante 12 horas um grupo de animais recebeu leite desnatado (0,1% de gordura), outro recebeu somente água e nosso grupo controle foi amamentado durante todo esse período. Passado esse tempo, os animais foram submetidos a microscopia confocal (**Figura 5B**) e foi observado que em ambos os grupos, leite desnatado e água, as gotículas estavam em menor quantidade e em menor tamanho, já os animais amamentados mostraram um expressivo aumento na área de gordura e no número de gotículas que a compunham (**Figura 5C -D**). Esses achados indicam que o leite materno pode ser a fonte da gordura hepática no início da vida, uma vez que foi observado claro contraste entre os grupos analisados.



**Figura 5: A gordura presente no fígado pode ser proveniente do leite materno: (A)** Representação esquemática do delineamento experimental. Fonte da gordura após o nascimento. **(B)** IVM evidenciando a deposição de gotículas lipídicas no parênquima hepático. Objetiva de 20X; barra= 65µm. **(C)** Quantificação da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem **(D)** Quantificação da área individual de cada gotícula lipídica. (média de 5 campos por animal, n≥2).

### 5.6 - Dinâmica da deposição de gordura – Do embrião à vida adulta

Diante de todo o exposto, estabelecemos o perfil e dinâmica de deposição da gordura hepática, partindo do embrião até a vida adulta (**Figura 6A**). O aumento e decréscimo de gordura ao longo das fases da vida (**Figura 6B**), evidencia o quanto mudanças na fonte de alimentação podem impactar o ambiente hepático.

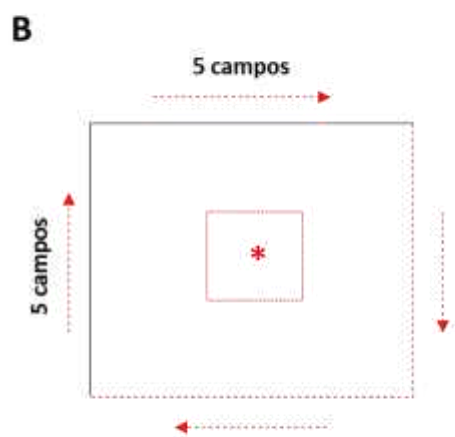
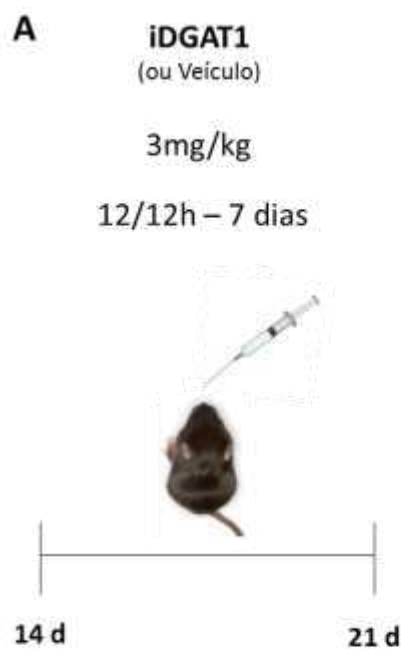


**Figura 6: Dinâmica da gordura ao longo da vida (A)** Painel completo da dinâmica gordurosa hepática ao longo da vida, (verde, Bodipy, 1mg/ml, 10 µl por amostra), e sinusóides hepáticos (em azul). **(B)** Quantificação geral da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem (média de 5 campos por animal, n≥5). Resultados exibidos como média ± SEM. \*p<0,05.

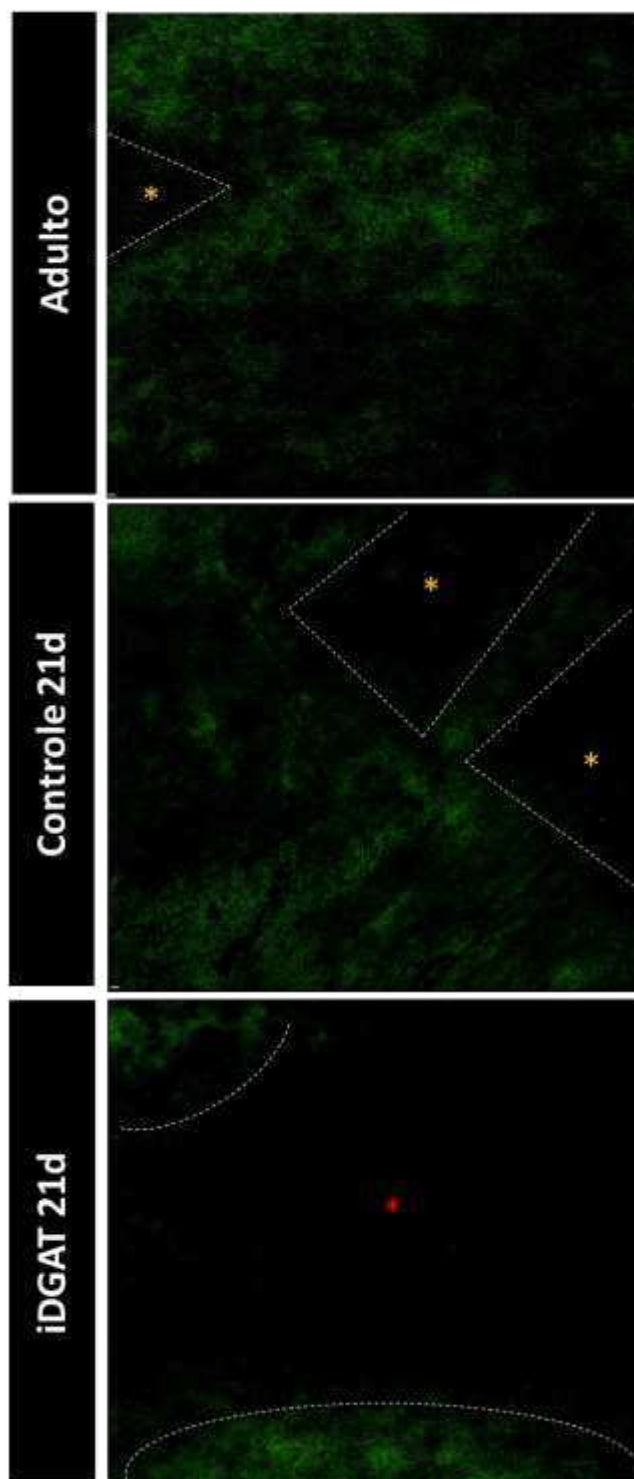


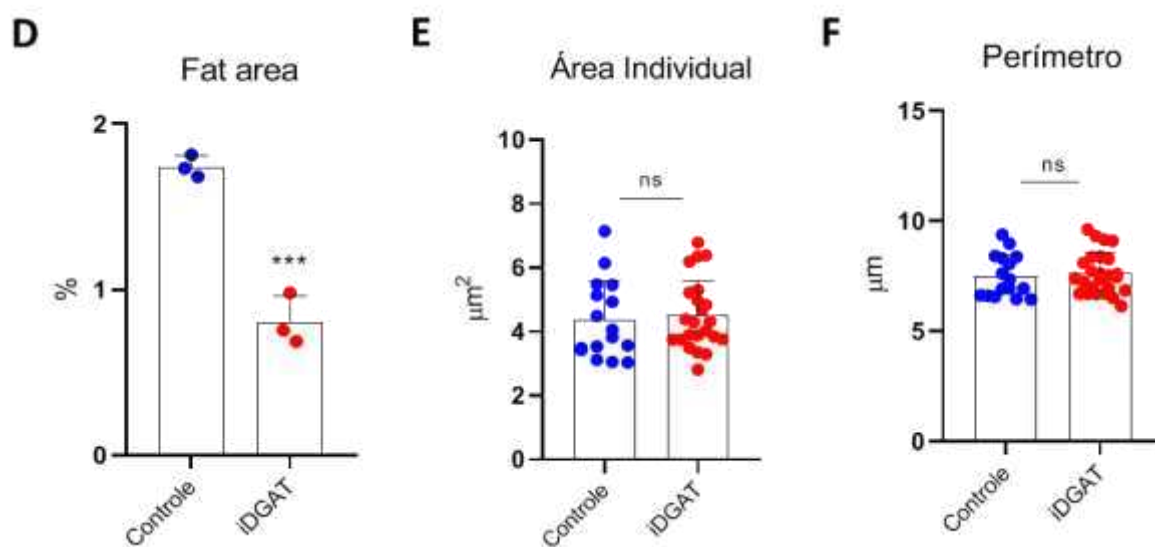
### 5.7 – Método de depleção de gordura hepática

Para entender o papel da gordura no ambiente hepático, nosso próximo passo foi padronizar um modelo de depleção. Assim, poderíamos observar possíveis mudanças no microambiente do fígado na ausência da gordura. Estabelecemos o protocolo de depleção com o inibidor de Diacilglicerol-acil-transferase-1 (iDGAT1) em animais adultos (dados não mostrados). Uma vez estabelecido, testamos o mesmo protocolo em animais mais jovens, com início do tratamento aos 14 dias de vida e término aos 21 dias, sendo administrada uma dose a cada 12 horas (3 mg/kg, via oral) (**Figura 7A**). Animais controle, de idade correspondente, receberam somente o veículo na mesma posologia. A fim de determinar o que era depleção por iDGAT1 e o que era somente diminuição da gordura decorrente da idade, comparamos o fígado de um animal adulto com os demais grupos descritos nesta seção. Para obter maior visualização do fígado como um todo, utilizamos uma *large image* (5x5) obtida por microscopia confocal (**Figura 7B**), desse modo uma maior área poderia ser visualizada e a descrição seria mais fidedigna. Nos animais adultos e controle 21 dias, foram observadas pequenas áreas dispersas ao longo do órgão sem a presença de gordura (áreas com asterisco amarelo), em contrapartida, o fígado de animais tratados com iDGAT1 exibiu extensa e contínua área sem vestígios de gotículas lipídicas (área com asterisco vermelho), assim, denominada área depletada (**Figura 7C**). Estabelecido o protocolo, obtivemos uma depleção de cerca de 50% da área de gordura em relação à animais controle da mesma idade (**Figura 7F**). Sabendo que existem outros mecanismos a jusante da ação de DGAT1 capazes de acrescentar triglicerídeos as gotículas de gordura pré formadas e que, poderiam alterar a fidelidade dos nossos dados no que tange a percentagem da área de gordura, quantificamos a área individual (**Figura 7G**) e o perímetro de cada gotícula em ambos os grupos (**Figura 7H**). Não foi observada diferença entre os animais controle e tratados, sugerindo que as gotículas pré existentes não sofreram efeitos de acréscimo de triglicerídeos devido a inibição de DGAT1.



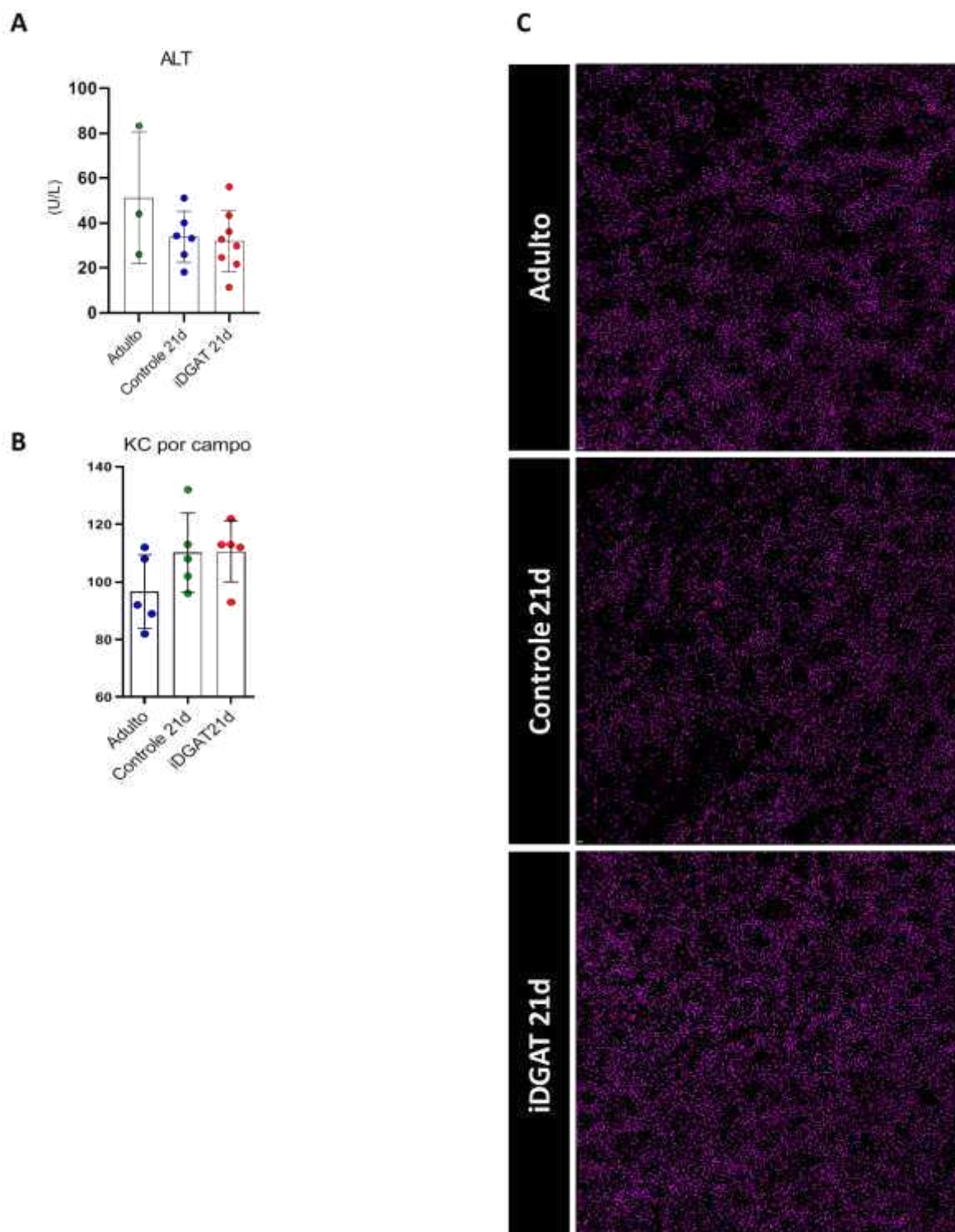
**C**





**Figura 7: Redução da gordura hepática por iDGAT.** (A) Dosagem do inibidor e desenho experimental. (B) Representação esquemática de uma Large Image. (C) Large Image (5x5) evidenciando a diferença entre a deposição de gordura entre os grupos. Animais adultos e controle apresentam pequenas áreas naturalmente sem gordura (asterisco amarelo) enquanto animais tratados apresentam uma extensa área de depleção (asterisco vermelho). (D-F) Quantificação geral da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem. (média de 5 campos por animal,  $n \geq 5$ ). Média do perímetro e área de cada gotícula, antes e após tratamento. Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Considerando que a gordura faz parte da fisiologia hepática no início da vida, qualquer intervenção com o intuito de eliminá-la poderia provocar lesões e alterar a composição celular do fígado. Assim sendo, dosamos a enzima Alanina Aminotransferase (ALT) (**Figura 6B**) no soro a fim de detectar possível necrose hepática decorrente da depleção de gordura, e quantificamos o número de células de Kupffer, uma vez que, por estar dentro dos sinusóides hepáticos, essas células são as primeiras a entrar em contato com o conteúdo advindo da circulação portal. Não foram detectados níveis elevados de ALT, resultado que sugere que o fígado não foi lesado durante o tratamento. Com relação as células de Kupffer, embora ligeiramente em maior quantidade nos animais de 21 dias de vida (controle e tratado) não diferiu de maneira significativa de um animal adulto (**Figura 6B-C**). Em conjunto esses dados sugerem que a depleção de gordura, nesse modelo, não foi prejudicial ao fígado ao ponto de ser detectada como necrose, e que as sutis diferenças no número de células de Kupffer podem ser decorrentes da idade, e não do tratamento e depleção em si.



**Figura 8: O tratamento não lesa o fígado e nem altera o número de células de Kupffer. (A)** Dosagem de ALT. **(B)** Quantificação geral da área preenchida por gordura em relação a área total da imagem (média de 5 campos por animal,  $n \geq 5$ ). Resultados exibidos como média  $\pm$  SEM.  $*p < 0,05$ . **(C)** Large Image (5x5) mostrando que, o número de células de Kupffer, embora ligeiramente maior, não foi alterado significativamente entre os grupos. (Em magenta, células de Kupffer marcadas com F4/80 PE).

## 6. Discussão

Os estudos acerca do acúmulo de gordura no fígado na primeira fase da vida, começaram a ser publicados por volta de 1910. Graham apontou o aparecimento de gotículas de gordura nas células parenquimatosas do fígado, de porcos e cachorros, após envenenamento por clorofórmio (Graham, 1912). A partir de então, casos clínicos também começaram a ser publicados, como o caso de dois bebês que, além de gordura no fígado, possuíam outras desordens associadas, como hiperproteinemia e doenças renais (Ødegard, 1947; Ødegard 1948; Hartz, 1949). Descrito, majoritariamente, em crianças com predisposição genética, ou em casos em que a mãe possui desordens associadas, como obesidade, síndrome metabólica (Reichetzeder,2021) e diabetes gestacional (Mann *et al.*, 2018), faltam estudos que discutam acerca do acúmulo de gordura hepática em um contexto fisiológico. A escassez de dados nesse campo, se deve ao contexto em que a gordura hepática é estudada. De fato, o acúmulo de gordura no fígado pode ser causa e consequência de diversas desordens, podendo culminar em cirrose, hepatocarcinoma e até mesmo em morte (Gariani, Jornayvaz, 2021). Porém, ácidos graxos, colesterol, triglicerídeos e outros derivados lipídicos são necessários pra quase todos os processos homeostáticos do corpo, indo desde a composição da membrana celular, participação no processo hematopoiético na medula óssea (Wang, Leng & Gong, 2018; Guerra, *et al.*, 2018) até a formação de mediadores pró e anti-inflamatórios, sugerindo que pode não ser somente a presença da gordura de uma forma geral, mas sim, a quantidade e qual o tipo. Sabendo então, que a gordura e seus derivados podem atuar em vertentes opostas, são necessários mais estudos relativos ao contexto fisiológico e do tipo de gordura presente em determinados locais, dessa forma, os processos poderão ser compreendidos de uma maneira mais fidedigna e completa.

No presente trabalho, nós demonstramos de maneira inédita, um acúmulo de gordura no fígado no período pós natal em animais saudáveis, onde o pico acontece na primeira semana de vida, decai com o aproximar do desmame e se estabiliza com a chegada da idade adulta. Coincidentemente, este é o período em que animal recém-nascido passa pelo primeiro desafio nutricional e ambiental. Visto que seu organismo foi “primado” com nutrientes advindos da circulação materna, e a posteóri, o mesmo está exposto à diferentes concentrações de nutrientes em um ambiente não estéril, esse acúmulo de gordura pode ser uma resposta do organismo por ter que lidar com

uma variedade nutricional ao qual a priori não estava exposto, e concomitantemente à colonização da microbiota. Bosch e colaboradores, demonstraram que em modelos de sepsis polimicrobiana e por LPS, houve um aumento de gotículas lipídicas, e as mesmas atuaram como centros reguladores da imunidade inata por meio da reprogramação do metabolismo celular em animais adultos (Bosch, *et al.*, 2020). Outros autores, evidenciaram o aumento de gordura intracelular em animais, também adultos, acometidos por infecção viral (por exemplo, hepatite B) bacteriana (tuberculose) e até mesmo parasitária (malária). O aumento de gordura nesses casos é explorado no que tange a replicação do patógeno e na resposta precisa das células em usar do conteúdo lipídico presente nas gotículas, para destruir os invasores (Bosch, *et al.*, 2021). Em um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, mostramos que em animais recém-nascidos as células de Kupffer, presente nos sinusóides hepáticos e responsável por patrulhar o sangue recém chegado ao órgão, não são totalmente funcionais até a primeira semana de vida (Nakagaki, *et al.*, 2018), outros dados não publicados, mostram que os neutrófilos, considerados a primeira linha de defesa do organismo e um dos pilares da imunidade inata, e que curiosamente estão em grande quantidade no fígado até a terceira semana de vida, não possuem a mesma capacidade migratória que os neutrófilos circulantes de um animal adulto. Tomados em conjunto, esses dados indicam que o acúmulo de gordura hepática nesta fase da vida pode ter um viés adaptativo ao meio desconhecido no qual o animal foi inserido, auxiliando em processos como a produção de mediadores derivados de lipídeos, com a finalidade de suprir a imaturidade das células imunes residentes, nesse período da vida.

Nossos dados mostraram também, que no embrião, em animais que receberam somente água e leite desnatado, o número de gotículas é menos expressivo se comparado com animais que foram amamentados. Juntos, esses achados indicam que o leite materno pode ser o principal provedor da gordura hepática no período pós-natal. Contribuindo assim, para a homeostase do organismo. O leite materno é apontado como fator chave para a saúde, entregando ao recém-nascido um equilíbrio de nutrientes, fatores bioativos, e recentemente têm-se discutido sobre a microbiota do leite (Andreas, Kampmann & Le-Doare, 2015; Lyons, *et al.*, 2020). Em contrapartida, Kong e colaboradores descreveram que o conteúdo lipídico do leite de mães com estilo de vida pouco saudável, atuou como DAMP e foi capaz de estimular a produção de mediadores inflamatórios como interleucina 17 e interleucina 22, neste

caso, os ácidos graxos de cadeia longa, foram apontados como o pivô desse perfil. Ainda neste estudo, os autores dissertam que a exposição precoce ou desbalanceada de recém-nascidos aos ácidos graxos não encontrados fisiologicamente no leite materno, podem predispor a doenças como dermatite atópica e outras desordens, intestinais e metabólicas (Kong, et al., 2021). Dessa forma, podem ser observadas consequências opostas da ingestão de leite materno, a primeira, em um contexto materno fisiológico onde o animal recebe todo o necessário para crescer saudável, e em contrapartida, o desbalanço na dieta pode predispor o animal a diversas patologias. São escassos os estudos relacionando a amamentação com o ambiente hepático, sendo assim nossos dados abrem portas para investigações acerca desse tema.

Para entender um pouco mais sobre o papel da gordura no ambiente hepático no início da vida, estabelecemos um modelo de depleção com iDGAT. Dessa forma, nosso primeiro passo foi observar se, de fato existiam áreas depletadas. A deposição de gordura no fígado é descrita em animais submetidos a dietas HFD e doenças hepáticas medicamentosas. Os autores levam em conta o zoneamento hepático e a expressão de genes relacionados a síntese e degradação de ácidos graxos no fígado para mapear as áreas em que mais se observa deposição de gordura. Em animais adultos, por exemplo, nota-se a presença mais expressiva de gordura em hepatócitos da zona pericentral, onde os genes lipogênicos são mais ativos, e zonas periportais são apontadas como mais lipolíticas em relação as demais. Por outro lado, no período pós-natal, alguns autores apontam o acúmulo de gordura como azonal, ou sem um padrão específico de deposição, podendo variar com o estímulo para tal condição. Nossos dados mostraram que em animais controle e animais adultos, pequenas áreas sem a presença de gordura foram observadas espalhadas pelo parênquima, já nos animais tratados por com iDGAT as áreas sem gotículas eram extensas. Tomados em conjunto, esses dados indiciam que a deposição de gordura em animais adultos saudáveis pode não seguir um padrão, uma vez que não é observada grande quantidade de gotículas no parênquima hepático. Apesar dos animais com 21 dias de vida apresentarem moderadamente mais gordura que os animais adultos, o padrão de deposição foi semelhante corroborando com a literatura a respeito de uma deposição azonal.

O conteúdo lipídico no fígado pode estar comprometido com vários processos celulares, como tráfego de membrana entre outros, dessa forma, impedir a formação

de gotículas de gordura pode ter viés prejudicial as células e ao parênquima. A fim de verificar se a depleção de gordura era capaz de provocar danos no parênquima hepático, utilizamos uma técnica de medição indireta de necrose hepática que é a dosagem de ALT sérico. Essa enzima está presente no interior dos hepatócitos e sua presença no soro está associada ao extravasamento do conteúdo intracelular, que é observado durante a necrose. Nossos resultados não mostraram níveis elevados dessa enzima no soro dos animais, sugerindo que a depleção da gordura no fígado não reflete em danos no microambiente hepático. No entanto, testes funcionais não foram realizados.

Seguindo a linha de investigar se as células de Kupffer, macrófagos residentes em um dos primeiros órgãos desafiados pelo *input* nutricional, eram afetadas pela depleção da gordura, quantificamos o número de células por campo e vimos que, embora diferente no animal adulto, o número dessas células não diferiu entre grupo tratado e controle sugerindo que as diferenças observadas podem ser decorrentes da idade e não do tratamento em si. O fato da célula de Kupffer estar presente no fígado antes mesmo deste ser tomado por gotículas de gordura (Mass, *et al.*, 2016), indicam que não há uma relação de dependência entre ambos. No entanto, em modelos de esteatose hepática, em animais adultos, realizados por nosso grupo de pesquisa, o acúmulo de gordura no fígado culminou em alterações morfofuncionais nas células de Kupffer prejudicando sua função fagocítica (Diniz, *et al.*, 2020) que foi recuperada quando a gordura foi parcialmente depletada por iDGAT (dados não publicados). Juntos, esses dados indicam o papel imuno-modulador dos lipídeos hepáticos em diferentes fases da vida do animal.

Em humanos, a esteatose pediátrica é, na maioria das vezes, consequência de fatores genéticos de malformações em veias que drenam para o fígado (Idilman, Ozdeniz & Karcaaltincaba, 2016)

## **7. Considerações Finais**

A esteatose hepática é caracterizada por um acúmulo exacerbado de gordura no parênquima hepático. Dentre as causas, são apontados a alta ingestão de alimentos ultra processados e hiper palatáveis ricos em carboidrato simples e gordura. Apesar de induzirem efeitos nocivos se ingeridos em excesso, os derivados lipídicos



são essenciais em quase todos os processos fisiológicos do organismo, indo desde o estoque energético até o suporte na defesa do hospedeiro contra possíveis patógenos. Todo esse processo é bem estabelecido na fase adulta.

Contrapondo conceitos de que todo acúmulo de gordura hepático é prejudicial, neste trabalho, nós abordamos de forma inédita, um acúmulo lipídico no período pós-natal que, de acordo com nossos dados é advindo do leite materno. Essa abundância lipídica pode ter um viés adaptativo ao novo ambiente em que o animal recém-nascido está inserido.

Nosso trabalho, embora em fase de caracterização, abre luzes para novas abordagens e estudos acerca período pós-natal, visto que, este período é capaz de modular todos os processos a jusante na vida do animal.

## Referências bibliográficas

- ALI, Omar. **Genetics of type 2 diabetes**. World journal of diabetes, v. 4, n. 4, p. 114, 2013.
- ALVES-BEZERRA, Michele; COHEN, David E. **Triglyceride metabolism in the liver**. Comprehensive Physiology, v. 8, n. 1, p. 1, 2017.
- ANDREAS, Nicholas J.; KAMPMANN, Beate; LE-DOARE, Kirsty Mehring. **Human breast milk: A review on its composition and bioactivity**. Early human development, v. 91, n. 11, p. 629-635, 2015.
- ANTUNES, Máisa Mota et al. **Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections**. Nutrition, v. 81, p. 110938, 2021.
- BEATH, S. V. **Hepatic function and physiology in the newborn**. In: Seminars in neonatology. WB Saunders, 2003. p. 337-346.
- BEN-MOSHE, Shani; ITZKOVITZ, Shalev. **Spatial heterogeneity in the mammalian liver**. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, v. 16, n. 7, p. 395-410, 2019.
- BLANCHETTE-MACKIE, E. Joan et al. **Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes**. Journal of lipid research, v. 36, n. 6, p. 1211-1226, 1995.
- BOSCH, Marta; PARTON, Robert G.; POL, Albert. **Lipid droplets, bioenergetic fluxes, and metabolic flexibility**. In: Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, 2020.
- BOZZA, Patricia T.; MAGALHÃES, Kelly G.; WELLER, Peter F. **Leukocyte lipid bodies—biogenesis and functions in inflammation**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1791, n. 6, p. 540-551, 2009.
- BOZZA, Patricia T. et al. **Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update**. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA), v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.

CHIANESE, Rosanna et al. **Impact of dietary fats on brain functions**. Current neuropharmacology, v. 16, n. 7, p. 1059-1085, 2018.

CHONG, Brandi M. et al. **Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion**. Trends in Endocrinology & Metabolism, v. 22, n. 6, p. 211-217, 2011.

CHOQUET, Hélène; MEYRE, David. **Genetics of obesity: what have we learned?**. Current genomics, v. 12, n. 3, p. 169-179, 2011.

CHRISTIANSEN, Kirsten; JENSEN, P. K. **Membrane-bound lipid particles from beef heart chemical composition and structure**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, v. 260, n. 3, p. 449-459, 1972.

CRUZ, André LS et al. **Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks**. Cell Death & Disease, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2020.

DANCYGIER, Henryk. **The liver as an immune organ**. In: Clinical Hepatology. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 141-152.

DINIZ, Ariane Barros et al. **Imaging and immunometabolic phenotyping uncover changes in the hepatic immune response in the early phases of NAFLD**. JHEP Reports, p. 100117, 2020.

FAZEL, Yousef et al. **Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease**. Metabolism, v. 65, n. 8, p. 1017-1025, 2016.

FUJIMOTO, Yasuyuki et al. **Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1644, n. 1, p. 47-59, 2004.

GARIANI, Karim; JORNAYVAZ, François R. **Pathophysiology of NASH in endocrine diseases**. Endocrine Connections, v. 10, n. 2, p. R52-R65, 2021.

GETZ, Godfrey S.; REARDON, Catherine A. **Apoprotein E and reverse cholesterol transport**. International journal of molecular sciences, v. 19, n. 11, p. 3479, 2018.

GUERRA, Daniel AP et al. **Adipocytes role in the bone marrow niche**. 2018.

GLUCHOWSKI, Nina L. et al. **Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications**. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, v. 14, n. 6, p. 343, 2017.

GRAHAM, Evarts A. **The pathogenesis of the hemorrhagic diseases of the newborn**. The Journal of experimental medicine, v. 15, n. 4, p. 307, 1912.

GRIJALVA, James; VAKILI, Khashayar. **Neonatal liver physiology**. In: Seminars in pediatric surgery. WB Saunders, 2013. p. 185-189.

HAMRICK, Mark W.; MCGEE-LAWRENCE, Meghan E.; FRECHETTE, Danielle M. **Fatty infiltration of skeletal muscle: mechanisms and comparisons with bone marrow adiposity**. Frontiers in endocrinology, v. 7, p. 69, 2016.

IDILMAN, Ilkay S.; OZDENIZ, Ilknur; KARCAALTINCABA, Musturay. **Hepatic steatosis: etiology, patterns, and quantification**. In: Seminars in Ultrasound, CT and MRI. WB Saunders, 2016. p. 501-510.

JARC, Eva; PETAN, Toni. Focus: Organelles: **Lipid droplets and the management of cellular stress**. The Yale journal of biology and medicine, v. 92, n. 3, p. 435, 2019.

JARC, Eva; PETAN, Toni. **A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators**. Biochimie, v. 169, p. 69-87, 2020.

JENNE, Craig N.; KUBES, Paul. **Immune surveillance by the liver**. Nature immunology, v. 14, n. 10, p. 996, 2013.

KLIP, Amira; VRANIC, Mladen. **Muscle, liver, and pancreas: Three Musketeers fighting to control glycemia**. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, v. 291, n. 6, p. E1141-E1143, 2006.

KONG, Weng Sheng et al. **Long-chain saturated fatty acids in breast milk are associated with the pathogenesis of atopic dermatitis via induction of inflammatory ILC3s**. Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 1-22, 2021.

LISTENBERGER, Laura L. et al. **Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, n. 6, p. 3077-3082, 2003.

LIU, Pingsheng et al. **Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic.** Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 5, p. 3787-3792, 2004.

LYONS, Katriona E. et al. **Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health.** Nutrients, v. 12, n. 4, p. 1039, 2020.

MAFRA, Kassiana et al. **The liver as a nursery for leukocytes.** Journal of leukocyte biology, 2019.

MALESPIN, Miguel; NASSRI, Ammar. **Endocrine diseases and the liver: an update.** Clinics in liver disease, v. 23, n. 2, p. 233-246, 2019.

MARQUES, Pedro E. et al. **Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy.** nature protocols, v. 10, n. 2, p. 258, 2015.

MARTIN, Sally; PARTON, Robert G. **Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle.** Nature reviews Molecular cell biology, v. 7, n. 5, p. 373-378, 2006.

MASS, Elvira et al. **Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis.** Science, v. 353, n. 6304, 2016.

MODI, Neena et al. **The influence of maternal body mass index on infant adiposity and hepatic lipid content.** Pediatric research, v. 70, n. 3, p. 287, 2011.

MORENO-CARRANZA, Bibiana et al. **Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice.** American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 314, n. 6, p. R902-R908, 2018.

MURPHY, Denis J. **The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals.** Protoplasma, v. 249, n. 3, p. 541-585, 2012.

NAKAGAKI, Brenda Naemi et al. **Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function.** Journal of hepatology, v. 69, n. 6, p. 1294-1307, 2018.

NGUYEN, PHUONGTRANG et al. **Liver lipid metabolism.** Journal of animal physiology and animal nutrition, v. 92, n. 3, p. 272-283, 2008.

OBER, Eike A.; LEMAIGRE, Frédéric P. **Development of the liver: Insights into organ and tissue morphogenesis.** Journal of hepatology, v. 68, n. 5, p. 1049-1062, 2018.

ORKIN, Stuart H.; ZON, Leonard I. **Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology.** Cell, v. 132, n. 4, p. 631-644, 2008.

PAGLIALUNGA, Sabina; DEHN, Clayton A. **Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease.** Lipids in health and disease, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2016.

PEREIRA-DUTRA, Filipe S. et al. **Fat, fight, and beyond: The multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation.** Journal of leukocyte biology, v. 106, n. 3, p. 563-580, 2019.

POPESCU, Dorin-Mirel et al. **Decoding human fetal liver haematopoiesis.** Nature, v. 574, n. 7778, p. 365-371, 2019.

RACANELLI, Vito; REHERMANN, Barbara. **The liver as an immunological organ.** Hepatology, v. 43, n. S1, p. S54-S62, 2006.

REICHETZEDER, Christoph. **Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics.** European Journal of Clinical Nutrition, p. 1-13, 2021.

RUI, Liangyou. **Energy metabolism in the liver.** Comprehensive physiology, v. 4, n. 1, p. 177, 2014.

SI-TAYEB, Karim; LEMAIGRE, Frédéric P.; DUNCAN, Stephen A. **Organogenesis and development of the liver**. *Developmental cell*, v. 18, n. 2, p. 175-189, 2010.

TAUCHI-SATO, Kumi et al. **The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TZEN, J. T.; HUANG, A. H. **Surface structure and properties of plant seed oil bodies**. *The Journal of cell biology*, v. 117, n. 2, p. 327-335, 1992.

UGALDE-NICALO, Patricia A.; SCHWIMMER, Jeffrey B. **On the origin of pediatric nonalcoholic Fatty liver disease**. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, v. 60, n. 2, p. 147, 2015.

WALTHER, Tobias C.; FARESE JR, Robert V. **Lipid droplets and cellular lipid metabolism**. *Annual review of biochemistry*, v. 81, p. 687-714, 2012.

WANG, Huifang; LENG, Yamei; GONG, Yuping. **Bone marrow fat and hematopoiesis**. *Frontiers in endocrinology*, v. 9, p. 694, 2018.

ZWEYTICK, Dagmar; ATHENSTAEDT, Karin; DAUM, Günther. **Intracellular lipid particles of eukaryotic cells**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, v. 1469, n. 2, p. 101-120, 2000.