

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARINA CHAVES DE OLIVEIRA

**CINÉTICA DE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
INFLAMATÓRIOS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS  
ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM CARBOIDRATOS  
REFINADOS**

Belo Horizonte  
2013

MARINA CHAVES DE OLIVEIRA

**CINÉTICA DE PARÂMETROS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS  
NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA  
EM CARBOIDRATOS REFINADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Nutrição, Alimentação e Saúde

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Belo Horizonte  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

**MARINA CHAVES DE OLIVEIRA**

**CINÉTICA DE PARÂMETROS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS NO  
FIGADO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM  
CARBOIDRATOS REFINADOS**

**APROVADA EM 27 DE JUNHO DE 2013**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Profa. Dra. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA**  
Orientadora e Presidente da Comissão

**Prof. Dr. FLÁVIO ALMEIDA AMARAL**

**Profa. Dra. MARIA ISABEL TOULSON DAVISSON CORREIA**

**Prof. Dr. VALBERT NASCIMENTO CARDOSO**

Aos meus pais Pedro e Zilda e meus irmãos Israel e Gleiser pelo apoio, incentivo e dedicação. Ao meu companheiro de caminhada Fernando, pelo amor incondicional, presença, ajuda e carinho em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha orientadora Adaliene (Dadá) por ter me aceitado como sua aluna, pelo companheirismo, dedicação, incentivo e cobrança. Compreensão nos momentos difíceis e compartilhamento da felicidade no recebimento dos meus presentes (resultados), a considero como a minha mãe da pesquisa;

Ao Mauro Teixeira e Danielle Souza que me acolheram em seus laboratórios, Imunofarmacologia e Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro (LIMHO), desde o período da iniciação científica para que eu conseguisse ter êxito e aprendizagem na pesquisa;

À minha mestra, Zélia Menezes-Garcia que me ensinou o caminho de todos os experimentos realizados, sempre com simplicidade, paciência e conhecimento, sendo um exemplo de pessoa na minha vida;

À todos os integrantes dos laboratórios de Imunofarmacologia e LIMHO, são tantas pessoas que ficaria muito difícil colocar o nome de todos. Contudo, com certeza sei que cada um contribuiu desde a forma mais simples até nos momentos de necessidade. São pessoas que admiro muito e sei que possuem um grande futuro pela frente nessa caminhada rumo a novas descobertas;

Em especial, às minhas companheiras de bancada Aninha, Débs, Jaque e Lalá, que me ajudaram demais e tornaram cada dia mais alegre, divertido, produtivo e sempre diferente. Sem a presença de cada uma de vocês, o laboratório não seria o mesmo!

E por fim, àqueles que fazem parte do meu mundo externo ao laboratório, que me formaram não somente com conhecimento, também como pessoa.

## RESUMO

A obesidade caracteriza-se por expansão do tecido adiposo e disfunção metabólica e inflamatória, sendo que as doenças hepáticas fazem parte das comorbidades associadas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética referente às alterações metabólicas e inflamatórias no fígado de camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados (HC). Camundongos BALB/c machos foram alimentados com dieta controle ou HC nos seguintes períodos experimentais: 1 e 3 dias, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, contudo sem alteração nas transaminases ALT e AST. Para as análises metabólicas do fígado, foi realizada quantificação de colesterol total e triglicérido. Observou-se maior conteúdo hepático desses lipídeos nos animais alimentados com dieta HC em todos os períodos experimentais. A expressão do RNAm para os genes de ChREBP, SREBP-1 e SREBP-2 foi realizada por PCR em tempo real. Não foi observada alteração nesses fatores de transcrição nos animais alimentados com dieta HC. Nas análises morfológicas com coloração H&E e tricrômico de Gomori, camundongos com dieta HC apresentaram maior hiperemia, esteatose, infiltrado inflamatório e inflamação perivascular. Também foi observado aumento transiente na área de deposição de colágeno. Em experimento separado, a microscopia intravital foi realizada em camundongos Lysm-eGFP para avaliação do infiltrado de neutrófilos no fígado. Os animais alimentados por 3 dias, 8 e 12 semanas com dieta HC apresentaram maior número de neutrófilos circulantes nos sinusóides hepáticos. A concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 apresentou-se maior no início do período experimental ao passo que foram menores a partir da 8<sup>a</sup> semana do consumo da dieta HC em relação aos controles. A concentração da IL-6 também foi menor a partir da 8<sup>a</sup> semana. As citocinas IL-13 e IL-4 apresentaram-se maiores a partir da 6<sup>a</sup> semana de dieta e mantiveram-se elevadas até o final do período experimental. O presente trabalho sugere que o consumo da dieta rica em carboidratos refinados induz disfunções hepáticas que incluem o acúmulo de gordura, aumento do infiltrado de células inflamatórias, dentre essas os neutrófilos, e alteração no perfil de citocinas. Como consequência ocorre modificação na morfologia e deposição de colágeno hepático.

**Palavras-chave:** dieta rica em carboidratos refinados, obesidade, esteatose hepática, esteatohepatite, deposição de colágeno.

## ABSTRACT

Obesity is characterized by adipose tissue expansion as well as metabolic and inflammatory dysfunction. Liver diseases are part of the associated comorbidities related to obesity. The aim of this study was to evaluate the kinetics of metabolic and inflammatory liver dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet (HC) in mice. BALB/c mice were fed a chow or HC diet in the following experimental periods: 1 and 3 days, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks. The animals fed HC diet presented hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia without changes in transaminases ALT and AST. It was observed higher level content of total cholesterol and triglyceride in animals fed HC diet in all experimental periods. The expression of mRNA for the genes of ChREBP, SREBP-1 and SREBP-2 was performed by real-time PCR. No alterations were observed in these transcription factors in the animals fed HC diet. In the morphological analysis evaluated with H&E and Gomori's trichrome staining, mice fed HC diet presented higher hyperemia, steatosis, inflammatory infiltrate and perivascular inflammation. It was also observed a transient increase in the area of deposited collagen. In separated experiment, intravital microscopy was performed in Lysm-eGFP mice to evaluate the neutrophil infiltration in the liver. Animals fed HC diet for 3 days, 8 and 12 weeks showed higher number of circulating neutrophils in hepatic sinusoids. The content of TNF- $\alpha$  and IL-10 was higher in the beginning of the experimental period while it was lower from the 8<sup>th</sup> week of consumption of HC diet compared to controls. The concentration of IL-6 was also lower from the 8<sup>th</sup> week of consumption of HC diet. The cytokines IL-13 and IL-4 presented higher levels from the 6<sup>th</sup> week of diet and remained high until the end of experimental period. The present work suggests that consumption of a high refined carbohydrate-containing diet induces liver dysfunction including fat deposition, infiltration of inflammatory cells, such as neutrophils, and altered cytokine profile. As a result, the liver showed morphological changes and collagen deposition in hepatocytes.

**Keywords:** high refined carbohydrate-containing diet, obesity, hepatic steatosis, steatohepatitis, collagen deposition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Mecanismos para a inflamação induzida por obesidade.....  | 18 |
| Figura 2 – Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas.....   | 21 |
| Figura 3 – Metabolismo do acúmulo de gordura hepática em disfunção ocasionada pela obesidade. ....   | 23 |
| Figura 4 - Perfil lipídico hepático e sorológico em camundongos alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) .....  | 38 |
| Figura 5 – Expressão do RNAm para os fatores de transcrição ChREBP, SREBP-1 e SREBP-2.....   | 39 |
| Figura 6 – Gráficos representativos da coloração com Hematoxilina-Eosina. ....   | 41 |
| Figura 7 – Análise morfológica do tecido hepático.....   | 42 |
| Figura 8 – Gráficos representativos da coloração com Tricrômico de Gomori.....   | 44 |
| Figura 9 – Análise da presença de fibrose no tecido hepático.....  | 45 |
| Figura 10 – Concentração das enzimas alaninoaminotransferase e aspartato aminotransferase.....   | 46 |
| Figura 11 – Concentração hepática da quimiocina quimioatraente para neutrófilos CXCL1 e neutrófilos acumulados em camundongos Lysm-eGFP..... | 48 |
| Figura 12 – Concentração hepática das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-13, IL-4 e IL-10. ...   | 50 |
| Figura 13 – Alterações metabólicas e inflamatórias apresentadas nos camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados. ....   | 59 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição nutricional das dietas controle (C) e rica em carboidratos refinados (HC)..... | 29 |
| Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos para as reações de PCR em Tempo Real.....                | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|              |   |  |
|--------------|---|--|
| ACC          | – | Acetil CoA Carboxilase                                     |
| Acetil-CoA   | – | Acetilcoenzima A   |
| AGL          | – | Ácidos graxos livres                                       |
| ALT          | – | Alanina aminotransferase                                   |
| AST          | – | Aspartato aminotransferase                                 |
| BSA          | – | Bovine Serum Albumin                                       |
| C            | – | Dieta controle   |
| CCL2         | – | Proteína quimioatraente para monócitos                     |
| CCL5         | – | RANTES   |
| ChREBP       | – | Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Carboidratos |
| CXCL1        | – | Proteína quimioatraente para neutrófilos KC                |
| CXCL2        | – | Proteína quimioatraente para neutrófilos MIP-2             |
| CXCL5        | – | Proteína quimioatraente para neutrófilos LIX               |
| DHGNA        | – | Doença hepática gordurosa não alcoólica                    |
| DNAc         | – | Cadeia complementar do ácido desoxirribonucleico           |
| eGFP         | – | Enhanced Green Fluorescent Protein                         |
| EHNA         | – | Esteatohepatite não alcoólica                              |
| ELISA        | – | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                          |
| GLUT-4       | – | Transportador de Glicose-4                                 |
| H&E          | – | Hematoxilina-Eosina  |
| HC           | – | Dieta rica em carboidratos refinados                       |
| HDL          | – | Lipoproteína de alta densidade                             |
| IDL          | – | Lipoproteína de densidade intermediária                    |
| IFN $\gamma$ | – | Interferon $\gamma$  |
| IL-1         | – | Interleucina-1   |
| IL-10        | – | Interleucina-10  |
| IL-13        | – | Interleucina-13  |
| IL-4         | – | Interleucina-4   |
| IL-6         | – | Interleucina-6   |
| LDL          | – | Lipoproteína de baixa densidade                            |
| LLP          | – | Lipase lipoprotéica  |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
| LSH              | - | Lipase hormônio sensível                                 |
| NF- $\kappa$ B   | - | Fator nuclear kappa B                                    |
| NKT              | - | Células T natural killer                                 |
| OPD              | - | o-fenilenodiamina  |
| PBS              | - | Phosphate Buffered Saline                                |
| PCR              | - | Reação da cadeia em polimerase                           |
| QM               | - | Quilomícron  |
| RNA <sub>m</sub> | - | Ácido ribonucleico mensageiro                            |
| ROS              | - | Espécies reativas de oxigênio                            |
| SREBP-1          | - | Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Esteróis-1 |
| SREBP-2          | - | Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Esteróis-2 |
| TG               | - | Triglicerídeos   |
| TGF- $\beta$ 1   | - | Fator transformador do crescimento- $\beta$ 1            |
| TNF- $\alpha$    | - | Fator de necrose tumoral- $\alpha$                       |
| VLDL             | - | Lipoproteína de densidade muito baixa                    |

# SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| 1.1      | JUSTIFICATIVA   | 13        |
| 1.2      | OBJETIVO GERAL  | 14        |
| 1.2.1    | <i>Objetivos específicos</i>  | 14        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | <b>15</b> |
| 2.1      | PAPEL DOS NUTRIENTES NAS COMPLICAÇÕES METABÓLICAS                                     | 15        |
| 2.2      | OBESIDADE, ADIPOSIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA                                       | 17        |
| 2.3      | FÍGADO  | 20        |
| 2.3.1    | <i>Metabolismo hepático</i>   | 20        |
| 2.3.2    | <i>Inflamação hepática</i>  | 24        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>29</b> |
| 3.1      | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL   | 29        |
| 3.2      | METODOLOGIA   | 31        |
| 3.2.1    | <i>Método de Folch e quantificação de lipídios</i>                                    | 31        |
| 3.2.2    | <i>Dosagens sorológicas</i>   | 31        |
| 3.2.3    | <i>Lâmina histológica</i>   | 31        |
| 3.2.4    | <i>Microscopia intravital</i>   | 32        |
| 3.2.5    | <i>Extração de citocinas dos tecidos</i>  | 33        |
| 3.2.6    | <i>Determinação de citocinas por ELISA</i>  | 33        |
| 3.2.7    | <i>PCR em Tempo Real (RT-PCR)</i>   | 34        |
| 3.2.7.1  | <i>Extração do RNA total</i>  | 34        |
| 3.2.7.2  | <i>Síntese de DNAc</i>  | 34        |
| 3.2.7.3  | <i>Reação de PCR em tempo real</i>  | 35        |
| 3.3      | ANÁLISE ESTATÍSTICA   | 36        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>37</b> |
| 4.1      | PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO E SOROLÓGICO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HC         | 37        |
| 4.2      | EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS À LIPOGÊNESE                   | 39        |
| 4.3      | ANÁLISE MORFOLÓGICA HEPÁTICA  | 40        |
| 4.4      | ANÁLISE HEPÁTICA DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO   | 43        |
| 4.5      | CONCENTRAÇÃO SOROLÓGICA DAS TRANSAMINASES ALT E AST                                   | 46        |
| 4.6      | INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NO FÍGADO DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM AS DIFERENTES DIETAS | 47        |
| 4.7      | CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HC          | 49        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b>  | <b>51</b> |
|          | REFERÊNCIAS   | 60        |
|          | ANEXO A   | 79        |

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica de proporções mundiais que vem crescendo de forma alarmante. É considerada um problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (W.H.O., 2012). A ocorrência envolve fatores sociais, comportamentais, ambientais, culturais, psicológicos, metabólicos e genéticos. Está associada a diversas comorbidades, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, câncer e resistência à insulina, dentre outras (Amine *et al.*, 2002). A obesidade é caracterizada pela expansão do tecido adiposo resultante, pelo menos em parte, do desequilíbrio energético, entre ingestão alimentar e gasto calórico (Wellen e Hotamisligil, 2003).

Os nutrientes, produtos obtidos após a transformação metabólica do alimento no organismo, estão associados com manutenção, crescimento e energia para a sobrevivência e o desenvolvimento humano (Koletzko *et al.*, 1998). Estudos mostram que fatores dietéticos são importantes em modular o aumento da adiposidade e a disfunção metabólica (Ng *et al.*, 2010; Sampey *et al.*, 2011). Inúmeros trabalhos têm demonstrado a participação das dietas ricas em lipídios no desenvolvimento da obesidade, tanto em humanos como em animais (Shepard *et al.*, 2001; Cameron-Smith *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2006; Buettner *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Por outro lado, sabe-se também que o aumento do consumo carboidratos pode contribuir para a obesidade e doenças relacionadas (Lumeng *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2011). Apesar de haver trabalhos que avaliam as alterações metabólicas desencadeadas tanto por dietas ricas em carboidratos como em lipídios, ainda são escassos os estudos que avaliam o efeito ao longo do tempo das disfunções metabólicas e imunológicas em sítios específicos decorrente do consumo de carboidratos refinados.

O tecido adiposo é o órgão de maior representatividade quando se trata da obesidade, por ser o principal local de estoque de gordura. Antes da década de 90, conhecia-se somente que a função desse tecido estava relacionada à reserva energética, proteção contra choques mecânicos e isolante térmico. Entretanto, sabe-se atualmente que o tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo e produtor de

adipocitocinas, que interagem com todo o organismo, por apresentar funções tanto endócrinas como inflamatórias (Greenberg e Obin, 2006; Balistreri *et al.*, 2010). Na obesidade, com a expansão do tecido adiposo, principalmente o visceral, há um infiltrado de células inflamatórias, tais como macrófagos, que aumentam a produção de mediadores inflamatórios, dentre essas citocinas e quimiocinas. Assim, instala-se um estado de inflamação crônica de baixa intensidade que afeta não somente o tecido adiposo, mas também cérebro, coração, pâncreas, aparelho reprodutivo e fígado (Wellen e Hotamisligil, 2003; Gregor e Hotamisligil, 2011).

O fígado é a principal unidade de produção e armazenagem de nutrientes do nosso organismo (Kierszenbaum, 2008). Por ser um órgão diretamente envolvido com o metabolismo de nutrientes, é um dos locais mais comprometidos pela obesidade, pois não consegue metabolizar a sobrecarga de nutrientes ingerida, ficando parte dos macronutrientes consumidos armazenados e acumulados na forma de lipídios (Liu *et al.*, 2010). O aumento de gordura nas células hepáticas pode evoluir para a esteatose, também conhecida como fígado gorduroso, e em casos mais graves para a esteatohepatite e cirrose hepática (Marceau *et al.*, 1999; Stanton *et al.*, 2011). A esteatose associa-se ao alcoolismo, como também a pacientes diabéticos tipo 2 ou acima do peso, em que ocorre hiperinsulinemia a fim de compensar a resistência à insulina, aumentando a estocagem de gordura no fígado (Marchesini *et al.*, 1999; Savage *et al.*, 2007). É bem estabelecido na literatura que o consumo de dietas hiperlipídicas ou ricas em carboidratos culmina em maior deposição de gordura em hepatócitos (Feldstein *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2005). Entretanto, o tempo necessário para a ocorrência das alterações hepáticas e imunológicas, decorrentes do consumo de dieta rica em carboidratos, não são bem elucidadas.

## 1.1 Justificativa

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.*, 2012) demonstraram que animais alimentados com dieta rica em carboidratos refinados (HC) durante diferentes períodos apresentaram aumento da adiposidade a partir de 1 dia, permanecendo até 12 semanas. O aumento da adiposidade induzido pela dieta HC não foi acompanhado por alterações no ganho de peso ou ingestão alimentar quando comparados aos animais alimentados com dieta controle. Entretanto, houve desenvolvimento de dislipidemia, hiperglicemia, intolerância à glicose e insensibilidade à insulina. Estas alterações foram acompanhadas por variação no perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo, como as citocinas interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-10 (IL-10), fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) e as quimiocinas proteína quimioatraente para monócitos (CCL2) e proteína quimioatraente para neutrófilos (CXCL1). Além disso, existem trabalhos na literatura mostrando que o consumo de dieta rica em carboidratos causa alterações no tecido adiposo e fígado (Schwarz *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2007; Chong *et al.*, 2008), contudo em relação aos refinados não é bem estabelecido quais seriam as possíveis conseqüências.

Considerando a existência de uma co-regulação entre o tecido adiposo e fígado, torna-se relevante investigar as possíveis alterações hepáticas decorrentes do consumo da dieta HC, uma vez que esse órgão está relacionado diretamente com o metabolismo de nutrientes. O entendimento da inter-relação entre o fígado e o tecido adiposo, bem como as repercussões sistêmicas das alterações desses órgãos, pode contribuir para avanços no entendimento de doenças crônicas, como a obesidade, e de interconexões.

## 1.2 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética referente às alterações metabólicas e inflamatórias no fígado de camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados.

### 1.2.1 Objetivos específicos

Avaliar em animais alimentados com dieta rica em carboidratos refinados, em curto- e longo-prazo:

- a. O acúmulo de gordura hepática e perfil lipídico mediante os seguintes testes:
  - Dosagens sorológicas e hepáticas de triglicerídeos e colesterol total;
  - Expressão gênica dos fatores de transcrição Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Esteróis-1 (SREBP-1), SREBP-2 e Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Carboidratos (ChREBP) por PCR em tempo real.
- b. Aspectos histopatológicos no fígado por meio de:
  - Escore histopatológico em lâminas com coloração H&E;
  - Coloração com tricrômico de Gomori para a quantificação do depósito de colágeno no parênquima e perivascular.
- c. Função hepática por meio de:
  - Análise sorológica das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).
- d. Inflamação no fígado a partir da:
  - Infiltração de neutrófilos no fígado por microscopia intravital;
  - Avaliação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-13 e quimiocina CXCL1 por ELISA.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Papel dos nutrientes nas complicações metabólicas

O nutriente é responsável pela manutenção, crescimento e desenvolvimento do organismo. Contudo, o desequilíbrio no consumo pode desencadear alterações que culminará a longo-prazo em doenças metabólicas crônicas (Amine *et al.*, 2002). Dessa forma, a composição nutricional do alimento torna-se importante a fim de assegurar maior bem estar ao indivíduo. Baseado nos padrões recomendados, o consumo de alimentos como frutas, verduras, legumes e cereais ainda permanece baixo e ocorre maior ingestão de carboidratos e gorduras, responsáveis pelo aporte calórico desarmônico ao indivíduo (Brasil, 2011). O perfil da alimentação no Brasil favorece o aparecimento de enfermidades como obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e doenças hepáticas (Popkin, 2009; Brasil, 2011). O conceito de Willet e Stampfer (2003) distingue os tipos de lipídios e carboidratos a serem ingeridos e ressalta que, nem todas as gorduras são causadoras de doenças e distúrbios associados e, nem todos os carboidratos são promovedores da saúde.

Por conter maior quantidade de calorias por grama, acredita-se que o consumo de gorduras contribua mais para o ganho de peso e desordens associadas do que os carboidratos. Contudo, independente da caloria, a escolha da qualidade do nutriente dentre os macronutrientes é relevante. No caso dos lipídios, deve-se optar pela redução do consumo das gorduras de origem animal, ricas em ácidos graxos saturados e de caráter aterogênico presentes em produtos cárneos, industrializados e fritos (Mata *et al.*, 1996; Bray e Popkin, 1998). Já são bem descritas na literatura as alterações causadas por dietas hiperlipídicas, como ganho de peso, aumento de adiposidade e alterações hepáticas em humanos (Milagro *et al.*, 2006). Entretanto, apesar das dietas ricas em lipídios estarem associadas ao aparecimento de doenças metabólicas crônicas, um novo cenário de consumo desenfreado de carboidratos, principalmente refinados, tem ganhado foco em relação aos atuais hábitos alimentares. A redução no consumo de carboidratos refinados é indicada em razão do alto índice glicêmico. Apesar disso, o consumo de refrigerantes e sucos artificiais, que possuem alta concentração de frutose e sacarose, tem ganhado espaço na

preferência dos brasileiros (Brasil, 2011). Embora não haja consenso na literatura, há evidências de que o açúcar consumido também provoque alterações significativas no organismo e desencadeie doenças crônicas (Popkin e Nielsen, 2003; Mattes e Popkin, 2009). Portanto, a escolha da dieta deve ser realizada de forma a considerar os efeitos dos diferentes nutrientes, diminuir os efeitos nocivos e, simultaneamente, promover saúde às pessoas que se submetem ao processo de reeducação nutricional (Sallis e Glanz, 2009).

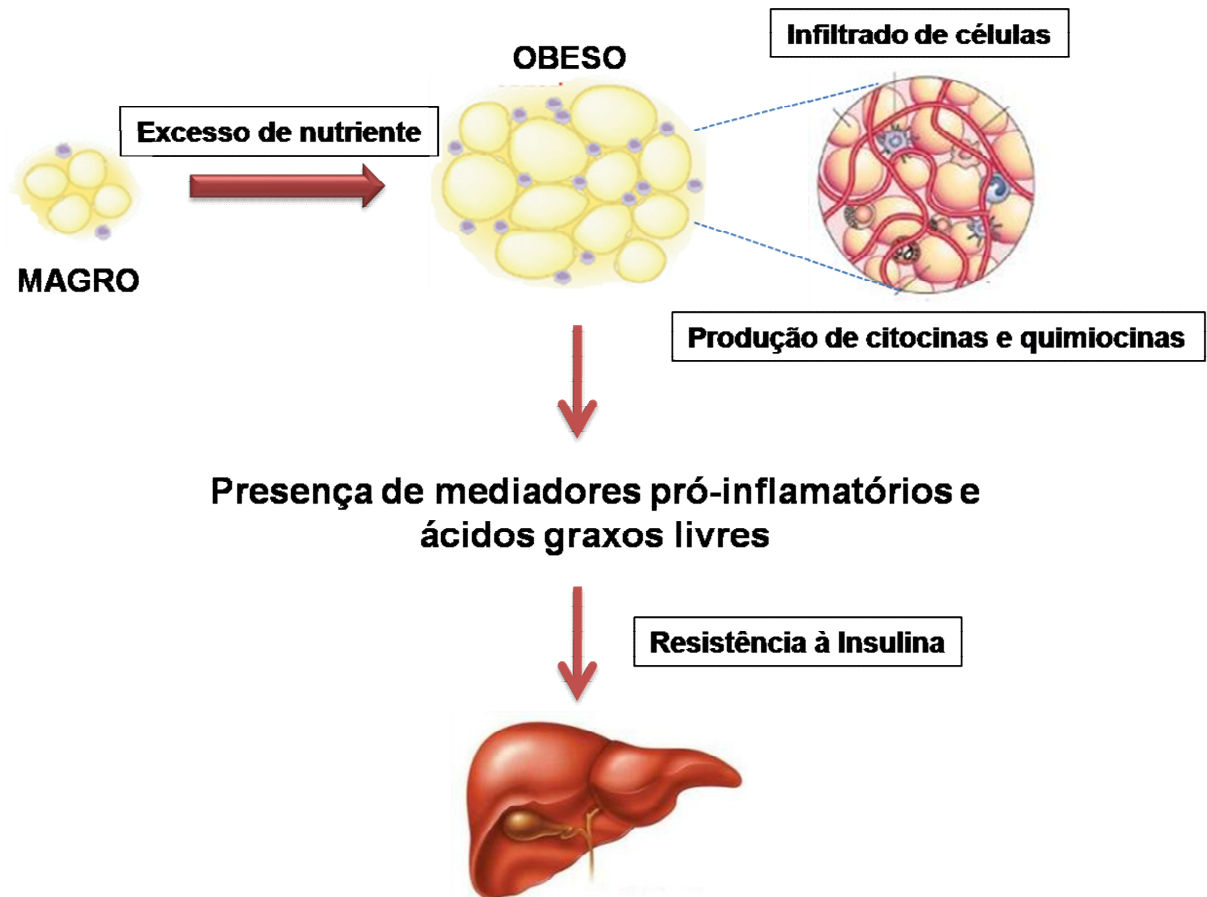
Em modelos experimentais, diversas composições dietéticas são utilizadas a fim de mimetizar os hábitos alimentares de diferentes populações, com suplementação ou supressão de nutrientes. As alterações na dieta ocorrem nos macronutrientes ou micronutrientes e são fornecidas como dieta habitual ao animal (Chandra, 1996; Ferreira *et al.*, 2011; Sampey *et al.*, 2011). O emprego de deficiências ou excessos em dietas formuladas provoca desordens metabólicas como hipertensão, diabetes, obesidade, magreza excessiva e outros transtornos (Erickson *et al.*, 2000; Hotamisligil e Erbay, 2008). Para indução da obesidade experimental, na maioria dos trabalhos, são utilizadas dietas com alteração na composição de macronutrientes, principalmente lipídios e carboidratos, com destaque maior para o primeiro grupo. Há evidências de que dietas contendo mais de 60% de lipídios são necessárias para que ocorram os efeitos obesogênicos, como aumento de adiposidade, dislipidemia e resistência à insulina em modelos animais (Buettner *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Os efeitos metabólicos de dietas ricas em sacarose também são bem estabelecidos em humanos (Abdulrhman *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2012). Apesar disso, ainda há escassez de estudos a respeito do mecanismo pelo qual a ingestão desse tipo de nutriente induz alterações metabólicas. Também não são bem elucidados quais seriam os efeitos da sobrecarga de consumo da sacarose, em curto- e longo-prazo, associados à ocorrência da obesidade. Diferentemente, o consumo de dieta hiperlipídica e as alterações metabólicas associadas têm sido expressivamente demonstrados na literatura nos últimos anos (Chess *et al.*, 2009; Llagostera *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Diante do aumento do consumo de carboidratos refinados por nossa população, torna-se importante estabelecer os mecanismos e os efeitos metabólicos e inflamatórios decorrentes do consumo de tal macronutriente em curto- e longo-prazo.

## 2.2 Obesidade, adiposidade e resistência à insulina

Segundo a Organização Mundial da Saúde (W.H.O., 2012), no mundo há mais de 1,4 bilhões de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 500 milhões destes obesos. A epidemia de obesidade afeta também as crianças, que vêm apresentando sobrepeso em idades cada vez mais jovens. A etiologia é multifatorial, contudo resulta, principalmente, do desequilíbrio entre atividade física insuficiente e alimentação rica em calorias (Popkin, 2009). Essa enfermidade encontra-se associada a diversas comorbidades, como diabetes tipo 2, doenças hepáticas e dislipidemias, que estão entre as doenças mais comuns da atualidade (Mokdad *et al.*, 2003; Rabe *et al.*, 2008). Sua caracterização está relacionada à expansão do tecido adiposo, com destaque ao visceral, sendo um importante fator preditivo de distúrbios lipídicos, glicídicos ou aterogênicos (Ibrahim, 2010). As disfunções metabólicas e inflamatórias, decorrentes do acúmulo de gordura corporal, podem ser iniciadas e mantidas principalmente através da ingestão de ácidos graxos saturados (El Akoum *et al.*, 2011) e carboidratos refinados (Stanhope *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012).

Na composição do tecido adiposo encontram-se adipócitos embutidos em uma rede de tecido conjuntivo frouxo contendo pré-adipócitos, fibroblastos, células imunológicas e vários outros tipos celulares (Nishimura *et al.*, 2009). Sabia-se que a sua descrição de função se restringia a depósito de energia. Atualmente, o mesmo é considerado como órgão endócrino ativo que, além de regular a homeostase energética e metabólica, libera mediadores bioativos como as adipocitocinas (Fantuzzi, 2005). No estado de inflamação de baixa intensidade, presente na obesidade, ocorre produção anormal de adipocitocinas, citocinas e quimiocinas, aumento dos marcadores pró-inflamatórios de fase aguda e a ativação dos sinalizadores inflamatórios (Gove e Fantuzzi, 2010). Além disso, vários estudos demonstram que a inflamação no tecido adiposo também está associada à infiltração progressiva de macrófagos e produção, pelos mesmos, de proteínas inflamatórias (Weisberg *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2006). O recrutamento de macrófagos pode ocorrer a partir da presença de quimiocinas, como a CCL2, em resposta à presença

de citocinas e conduzir à inflamação e resistência à insulina (Xu *et al.*, 2003). A **Figura 1** representa o processo inflamatório decorrente do aumento de adiposidade.



**Figura 1 – Inflamação induzida por aumento de adiposidade.** O acúmulo de lipídios e expansão do tecido adiposo acarreta no início do processo inflamatório. Concomitantemente, há produção de citocinas e quimiocinas pelos adipócitos. Com o aumento da expressão de moléculas de adesão e produção de quimiocinas ocorre o recrutamento de células imunológicas para o tecido adiposo, incluindo monócitos, que se diferenciam em macrófagos. O milieu inflamatório, por sua vez, contribui para a ocorrência da resistência à insulina. (Adaptação de: Shoelson *et al.*, 2007)

O impacto da quantidade de gordura corporal sobre a sensibilidade à insulina tem levado à investigação de mecanismos relacionados ao tecido adiposo que interfiram na via de sinalização da insulina (Fantuzzi, 2005; Bastard *et al.*, 2006; Das, 2007). A resistência à insulina é definida por alteração na resposta dos órgãos-alvo sensíveis a esse hormônio, como tecido adiposo, fígado e músculo. A insulina atua na regulação da captação de glicose e concentração de ácidos graxos livres (AGL) circulantes (Reaven, 2005; Guilherme *et al.*, 2008). No tecido adiposo, esse

hormônio diminui a lipólise, reduzindo assim o efluxo de AGL dos adipócitos. Todavia, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , que ocorre na obesidade, contribui para o efeito oposto. Elevada concentração de AGL circulantes é um dos principais fatores que podem causar resistência à insulina, tanto em animais como em humanos (Kelley *et al.*, 1993; Boden, 1997). Por outro lado, mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e adiponectina, exercem aumento na sensibilidade à insulina (Zeyda *et al.*, 2007). No fígado, a insulina inibe a gliconeogênese; no músculo esquelético e adipócitos, induz predominantemente a captação da glicose pelo estímulo da translocação do transportador de glicose-4 (GLUT-4) para a membrana plasmática (Saltiel e Kahn, 2001). Portanto, uma vez que esse hormônio modula importantes vias metabólicas para a manutenção da homeostase, qualquer disfunção relacionada ocasiona resistência à insulina com concomitante aumento de AGL e redução da captação e utilização de glicose pelas células.

A avaliação de sítios metabólicos distintos auxilia na compreensão da complexa integração entre os diferentes sistemas para o controle da homeostase metabólica e inflamatória, assim como de alterações que culminam em contexto patológico. Trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.*, 2012) demonstrou que camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados apresentam alteração tanto da resposta inflamatória quanto metabólica, em curto- e longo-prazo, que parecem ser desencadeadas e residir no tecido adiposo. Tal evidência destaca a importância desse tecido no desarranjo metabólico. Entretanto, outros sítios metabólicos críticos podem estar envolvidos durante o curso da expansão da massa adiposa e o estabelecimento de quais desordens podem ser advindas do consumo de determinados nutrientes em outros órgãos, ainda é questão a ser elucidada.

## 2.3 Fígado

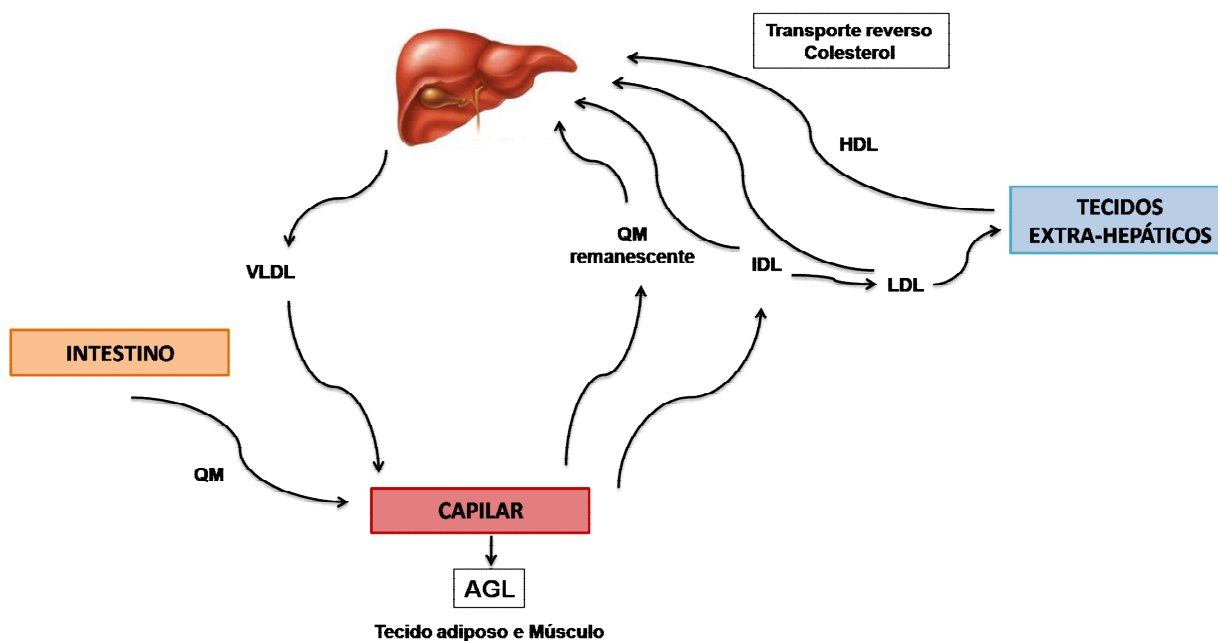
O fígado é composto por células epiteliais, os hepatócitos, organizados em placas e dispostos na unidade estrutural chamada lóbulo hepático. Entre os hepatócitos estão presentes os vasos sinusóides e estes são circundados pela bainha de fibras reticulares. Os sinusóides contêm macrófagos, denominados células de Kupffer, que desempenham diversas funções hepáticas que incluem principalmente: fagocitar microorganismos e outros detritos, além de secretar proteínas inflamatórias (Bilzer *et al.*, 2006; Kierszenbaum, 2008). O fígado auxilia no processo digestivo e no metabolismo de diversos tecidos, pois atua no controle da gliconeogênese, estoque de glicogênio (Bollen *et al.*, 1998), síntese e secreção de colesterol (Kang e Davis, 2000) e lipogênese (Kersten, 2001). Além disso, é um órgão que regula a biotransformação e eliminação de compostos tóxicos, síntese de proteínas, metabolização e armazenamento de nutrientes, sendo também estruturalmente regenerável.

### 2.3.1 Metabolismo hepático

Considerado um órgão metabólico, o fígado atua ativamente no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. O transporte de lipídios no organismo é descrito em duas vias: exógena, proveniente da dieta, com transporte do intestino para o fígado; e endógena, correspondente às lipoproteínas produzidas nos hepatócitos, transportadas do fígado para os tecidos periféricos (**Figura 2**). Três lipídios são importantes e principais na composição das lipoproteínas. Os triglicerídeos, que constituem a principal forma de gordura ingerida e armazenada, formado por ácidos graxos e glicerol; o colesterol, sintetizado no fígado; e os fosfolipídios, que são produzidos a partir de aminas.

A gordura provinda da dieta é absorvida no intestino pelos enterócitos, conjugada a apolipoproteínas e exportada para o sistema linfático sob a forma de quilomícron (QM). Os triglicerídeos presentes nos mesmos são hidrolisados pela lipase lipoprotéica (LLP) produzindo o QM remanescente, sendo posteriormente removido pelo fígado (Kwiterovich, 2000). As duas principais classes de lipoproteínas

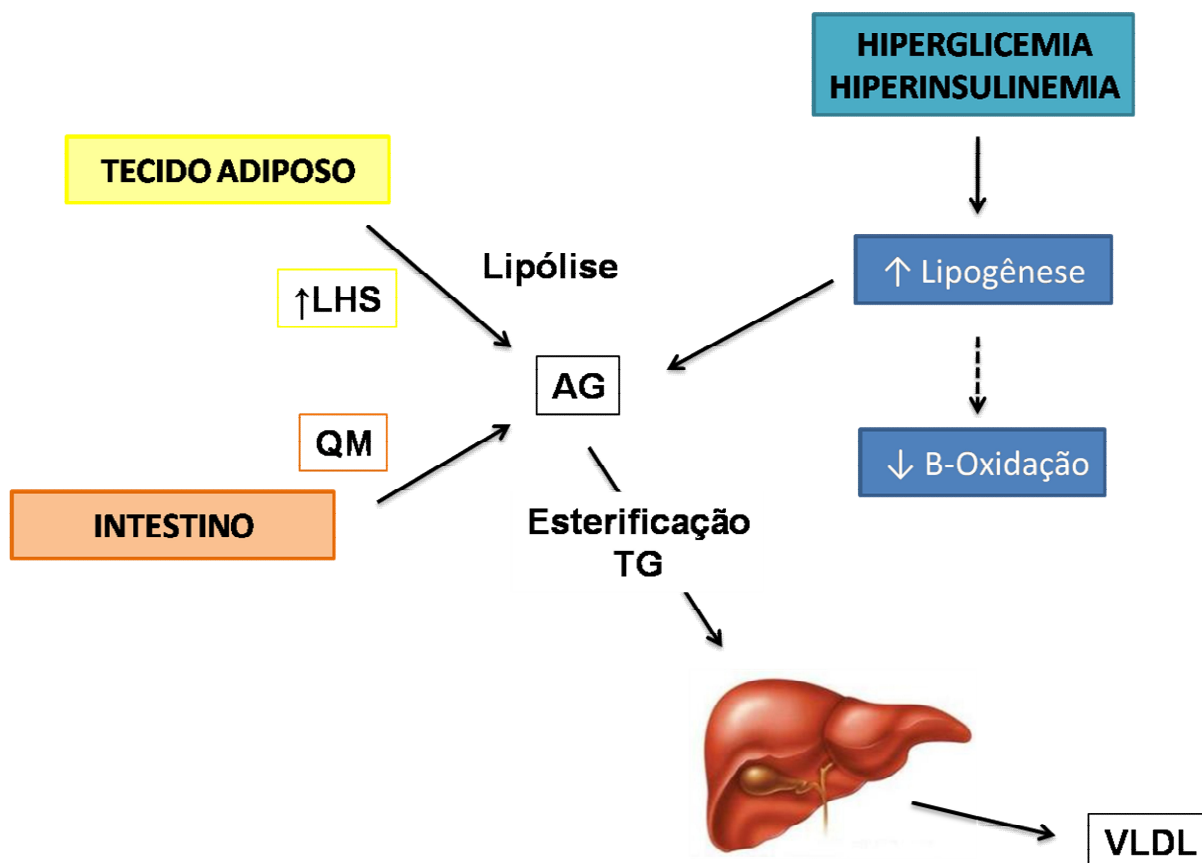
secretadas pelo fígado são: lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). As VLDL têm como função o transporte dos triglicerídeos endógenos e do colesterol para os tecidos periféricos para serem armazenados ou utilizados como fonte de energia (Kwiterovich, 2000). Além dessas vias, o transporte reverso do colesterol auxilia na remoção desse dos tecidos periféricos por meio de partículas de HDL formadas inicialmente no fígado (Von Eckardstein *et al.*, 2001). O desequilíbrio no metabolismo lipídico pode ocasionar acúmulo de gordura nos hepatócitos, por conseguinte, disfunção hepática, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Marchesini e Forlani, 2002). Nessa doença, o principal estoque é de triglicerídeos e a resistência à insulina está associada à ocorrência (Marchesini e Forlani, 2002; Bertram *et al.*, 2012).



**Figura 2 – Metabolismo de lipoproteínas plasmáticas.** Vias exógena e endógena e transporte reverso de colesterol. Na via exógena, os lipídios da dieta são transportados por meio de QM, que, por sua vez, são hidrolisados pela lipase lipoprotéica para liberar ácidos graxos para o músculo e tecido adiposo. A partir dessa hidrólise são gerados os QM remanescentes que irão para o fígado. Na via endógena, das VLDL que são formadas no fígado são retirados os triglicerídeos por tecidos extra-hepáticos. Os remanescentes, que são ricos em colesterol, são as LDL. A LDL é a principal fonte de deposição de colesterol nos tecidos periféricos. A HDL é responsável pela captação periférica de colesterol e atua no seu transporte reverso em direção ao fígado a fim de ser metabolizado e utilizado para a síntese de sais biliares. QM = quilomícra, VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa, HDL = lipoproteína de alta densidade, IDL = lipoproteína de densidade intermediária, LDL = lipoproteína de baixa densidade, AGL = ácidos graxos livres. (Adaptação de: Nelson e Cox, 2004)

Os triglicerídeos plasmáticos provêm de duas fontes, intestino e fígado, e dependem do estado nutricional do indivíduo. No jejum, os ácidos graxos provenientes do tecido adiposo são captados pelo fígado e excretados como VLDL (Sundaram e Yao, 2010). O aumento da secreção de VLDL hepático, caracterizado por hipertrigliceridemia, pode ocorrer devido ao maior influxo de AGL no fígado por aumento da lipólise no tecido adiposo, lipogênese hepática aumentada pela resistência à insulina ou ser proveniente de quilomícra (Taghibiglou *et al.*, 2000). Além disso, a presença de AGL contribui para a reesterificação de triglicerídeos e depósito hepático dos mesmos (Pagano *et al.*, 2002; Postic e Girard, 2008) (**Figura 3**). Em contrapartida, no estado pós-prandial, a síntese *de novo* de ácidos graxos em mamíferos depende da disponibilidade de carboidratos provindos da dieta para gerar acetil-CoA (Sundaram e Yao, 2010). O alto consumo de dieta rica em carboidratos, devido à demasia na produção de acetil-CoA, permite ao organismo estocar o excedente, principalmente como triglicerídeos (Haubert *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). A glicose, por ser convertida a acetil-CoA por meio da via glicolítica, estimula a lipogênese por ser substrato para tal processo e age na liberação de insulina, que aumenta a captação de glicose pelas células e ativa enzimas glicolíticas e lipogênicas (Iritani *et al.*, 1992). Dietas ricas em carboidratos também podem influenciar a expressão de enzimas relacionadas à lipogênese, como acetil-CoA carboxilase, que catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA; e a ácido graxo sintase, tendo como produto final o palmitato (Iritani *et al.*, 1992), contribuindo, dessa forma, com maior depósito de gordura no fígado.





**Figura 3 – Acúmulo de gordura hepática associado à resistência à insulina na obesidade.** Na condição de resistência à insulina, não há inibição adequada da LHS, conseqüentemente, ocorre maior lipólise no tecido adiposo e transporte de AGL para o fígado. Os ácidos graxos provindos da dieta são também captados pelo fígado por meio de partículas de QM. Além disso, a combinação de hiperglicemia e hiperinsulinemia promove a síntese de novo de ácidos graxos (lipogênese) e inibe a  $\beta$ -oxidação, o que contribui para o desenvolvimento de esteatose hepática. Após a esterificação, os TG podem ser armazenados em gotículas de lipídios nos hepatócitos ou secretadas para o sangue como VLDL. TG = triglicerídeos, LHS= lipase hormônio sensível, QM = quilomícra, AGL = ácidos graxos livres, AG = Ácidos graxos, VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa. (Adaptação de: Postic e Girard, 2008).

Os mecanismos envolvidos no aumento da lipogênese hepática são bastante complexos. Dentre a ativação de genes já elucidados, encontram-se os fatores de transcrição de membrana, como os da família da Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Esteróis (SREBP). O SREBP-1 está relacionado à ativação de genes lipogênicos por meio das isoformas SREBP-1a e SREBP-1c, sendo o que o último é expresso predominante no fígado e possui papel importante na síntese de AGL. Da mesma família, há também o SREBP-2 relacionado especificamente com a

síntese de colesterol (Horton *et al.*, 2002). Outro fator de transcrição importante é a Proteína Ligadora do Elemento Responsivo para Carboidratos (ChREBP), que coordena a regulação da transcrição de enzimas que canalizam os produtos glicolíticos finais para a via lipogênica (Uyeda e Repa, 2006). Já é descrito na literatura que os componentes dietéticos influenciam a expressão de genes lipogênicos no fígado. Segundo Horton *et al.* (1998), camundongos realimentados com dieta rica em carboidratos após período de jejum apresentam maior expressão de SREBP-1 hepático. Estudo de Yamashita *et al.* (2001) demonstrou que a expressão de ChREBP no fígado é induzida especificamente por dietas ricas em carboidratos, uma vez que essa se encontra reduzida em ratos alimentados com dieta rica em lipídios.

O acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos é um mecanismo natural, utilizado para estocar energia. Entretanto, em situações de sobrecarga ocorre a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Na DHGNA o acúmulo de gordura no fígado não está relacionado ao uso de álcool e a esteatose pode ser caracterizada pela presença de macro- e microvesículas (Mendez-Sanchez *et al.*, 2007). Diferentes agentes e condições patológicas estão associados à DHGNA, como resistência à insulina adquirida, erros inatos do metabolismo, ganho de peso, e algumas drogas e toxinas (Clark *et al.*, 2002). Essa doença tem sido alvo de inúmeras pesquisas, pois o aumento da incidência tem coincidido com a epidemia de obesidade nos países desenvolvidos. A relevância clínica da ocorrência da DHGNA está no fato de a esteatose também estar associada a mais uma característica da síndrome metabólica (Marchesini *et al.*, 2001). Além disso, o acúmulo de gordura hepática decorrente do consumo de determinados nutrientes associa-se com a ocorrência de alterações metabólicas e também com aumento da inflamação no fígado.

### **2.3.2 Inflamação hepática**

Além da DHGNA, outro distúrbio pode se manifestar no fígado, a esteatohepatite não alcoólica (EHNA). A EHNA é a forma mais extrema da DHGNA, que pode ser considerada como uma das principais causas de cirrose do fígado de causa desconhecida (Marchesini e Forlani, 2002; Tilg e Moschen, 2008). Nesse caso, a presença da esteatose está relacionada à inflamação no fígado (hepatite), cuja

causa exata ainda não é bem estabelecida. Marcadores plasmáticos de função hepática são utilizados a fim de diagnosticar alguma alteração hepática, como as transaminases alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Karmen *et al.*, 1955). Essas enzimas catalisam especificamente a reação de transaminação. Estão amplamente distribuídas nas células, especialmente no fígado e no miocárdio, além dos rins e músculo esquelético, e em baixas concentrações no sangue, porém, apresentam-se elevadas em caso de lesões celulares (Lee, 1969; Healey *et al.*, 1995). O aumento de AST pode indicar infarto do miocárdio, e o de ALT, lesão hepática, sendo importantes para diagnóstico na tentativa de reversão do dano causado (Lee, 1969; Tazawa *et al.*, 1997). Em pacientes com DHGNA foram observadas alterações nas concentrações de ALT e AST na presença concomitante de fibrose ou EHNA (Das e Balakrishnan, 2011). Além disso, essas enzimas estão aumentadas em modelo animal de esteatohepatite (alimentados com dietas deficientes em metionina e colina) (Yamaguchi *et al.*, 2007), sendo também associadas ao aumento na concentração de outros mediadores inflamatórios, como as citocinas.

Em modelos animais de obesidade, a expressão gênica de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , encontra-se aumentada no fígado e parece ser decorrente do acúmulo de gordura no órgão (Cai *et al.*, 2005). É bem descrito na literatura que o TNF- $\alpha$  aumenta a resistência à insulina (Xu *et al.*, 2003). Além desse efeito, essa citocina estimula a síntese hepática de ácidos graxos, aumenta a concentração de triglicerídeos no soro (Feingold *et al.*, 1990) e a produção de VLDL pelo fígado (Grunfeld e Feingold, 1992). Ademais, o TNF- $\alpha$  pode induzir tanto a morte celular quanto a proliferação de hepatócitos (Wullaert *et al.*, 2007), além de estar envolvido na patogênese da fibrose hepática em modelo de EHNA (Tomita *et al.*, 2006). Por outro lado, a IL-10 possui papel protetor contra o dano hepático causado por diferentes agressores. A inibição da IL-10 promove a expressão de citocinas envolvidas na inflamação, deterioração da sinalização de insulina e ativação das vias glicolítica e lipogênica (Cintra *et al.*, 2008). A atuação da IL-6 ainda é controversa, pois é descrita tanto como promotora da inflamação no fígado (Park *et al.*, 2010), quanto atuante na regeneração hepática (Peters *et al.*, 2000). O aumento de citocinas, no fígado de animais obesos, sugere que a esteatose induz a resposta inflamatória subaguda no fígado, semelhante à observada em adipócitos

hipertrofiados; ou ainda que citocinas pró-inflamatórias, lipídios e outras substâncias produzidas na gordura visceral podem ser transportados para o fígado, pela circulação, contribuindo para a inflamação hepática (Shoelson *et al.*, 2007). Em casos mais avançados, além da inflamação na EHNA, outro fator importante a ser observado é o aparecimento da fibrose hepática.

A ocorrência da fibrose está relacionada a lesões crônicas no fígado, sendo que a EHNA foi reconhecida como a maior causa dessa disfunção (Brunt, 2004). A incidência encontra-se mais precoce, devido ao aumento da ocorrência da obesidade e desordens associadas (Bataller e Brenner, 2005). O termo fibrose refere-se ao excesso da deposição de colágeno, proteoglicanos, e outras macromoléculas na matriz extracelular em resposta às lesões repetitivas no fígado (Friedman, 2003). O evento central para a ocorrência da fibrose é a ativação, por meio de citocinas fibrogênicas, de células estreladas; principal fonte de componentes da matriz extracelular e produtoras de colágeno. Outras células, tais como fibroblastos portais e as derivadas da medula óssea, também podem estar envolvidas no processo fibrogênico (Friedman, 2003). Citocinas e quimiocinas possuem papel regulatório na resposta inflamatória à lesão e modulam a fibrogênese hepática *in vivo* e *in vitro* (Marra, 2002; Fainboim *et al.*, 2007). As quimiocinas CCL2 e CCL5 estimulam a fibrogênese, enquanto as citocinas IL-10 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) atuam de forma oposta (Shi *et al.*, 1997; Schwabe *et al.*, 2003; Fainboim *et al.*, 2007). Dentre os fatores de crescimento, o TGF- $\beta$ 1 é um mediador chave na fibrogênese (Gressner *et al.*, 2002). Essa citocina ativa as células estreladas hepáticas, favorecendo a transição para um fenótipo semelhante aos miofibroblastos que produzem colágeno, estimulam a síntese de proteínas da matriz extracelular, e inibem a degradação. Observou-se, em modelos experimentais, que a interferência na via ou síntese de TGF- $\beta$ 1 diminui a fibrose (Shek e Benyon, 2004). Além do TGF- $\beta$ 1, as citocinas anti-inflamatórias e pró-fibrogênicas, IL-4 e IL-13, podem ser produzidas pelas células T natural killer (NKT), sendo essas células a fonte predominante (Kronenberg, 2005). Apesar das últimas citocinas atuarem como anti-inflamatórias contra o processo inflamatório que se instala na EHNA, a atuação é paradoxal, já que também podem estar associadas na progressão da fibrose. Várias células imunológicas também são importantes na progressão da EHNA; sendo que

os macrófagos são os mais presentes, pois somente a ativação local já gera resposta inflamatória.

Trabalhos prévios sugerem que na obesidade, diferentemente do tecido adiposo, o fígado não apresentava infiltrado de macrófagos (Cai *et al.*, 2005; Lanthier *et al.*, 2010); ocorrendo predominantemente ativação dos macrófagos residentes, as células de Kupffer (Baffy, 2009). Entretanto, estudo de Obstfeld *et al.* (2010) demonstrou que população distinta dos macrófagos residentes é recrutada para o fígado durante o desenvolvimento da obesidade. No fígado, os macrófagos residem no lúmen dos sinusóides, aderidos às células endoteliais que compõem a parede dos vasos sanguíneos. São ativados por substâncias pró-inflamatórias e compreendem 80% a 90% dos macrófagos presentes no organismo (Bilzer *et al.*, 2006). O estado de ativação pode variar entre o clássico (pró-inflamatório, M1) ou alternativo (anti-inflamatório, M2) (Gordon e Martinez, 2010). No clássico, essas células implicam em resistência à insulina induzida por obesidade e esteatose hepática. Contudo, no alternativo pode melhorar a resistência à insulina (Odegaard *et al.*, 2008). O acúmulo de lipídios no fígado leva a inflamação hepática subaguda via ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a produção de citocinas que podem causar a resistência à insulina local e sistemicamente (Cai *et al.*, 2005). Além disso, a sinalização do TNF- $\alpha$  na ativação das células de Kupffer parece ser essencial no desenvolvimento da esteatohepatite (Yang *et al.*, 1997) e fibrose hepática (Tomita *et al.*, 2006).

Além do envolvimento de macrófagos na determinação das características patológicas da EHNA, outras células, incluindo neutrófilos parecem ser importantes (Brunt *et al.*, 1999). Os neutrófilos são células polimorfonucleares, reconhecidos como as mais atuantes durante a inflamação aguda (Brinkmann *et al.*, 2004). São tipicamente os primeiros a serem recrutados ao sítio inflamatório e eliminam patógenos por diferentes mecanismos (Mantovani *et al.*, 2011). Podem contribuir com a resolução da inflamação (Soehnlein e Lindbom, 2010) ou modulação da resposta adaptativa (Mantovani *et al.*, 2011), entretanto, a persistência nos tecidos pode levar a lesão celular (Varani e Ward, 1994). Proteínas quimioatraentes como CXCL1, CXCL2 e CXCL5, via receptor para quimiocinas CXCR2, ativam os

neutrófilos e promovem adesão ao endotélio a fim de que sejam infiltrados no tecido (Williams *et al.*, 2011). O recrutamento de neutrófilos para as veias hepáticas, portal e central, envolve o rolamento e subsequente adesão dos mesmos. Entretanto, quando recrutados para os capilares sinusóides aderem diretamente ao endotélio hepático (Wisse *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 1997). Os neutrófilos estão presentes nas doenças hepáticas crônicas, induzindo não somente dano, como também inflamação a partir da infiltração no fígado (Uehara e Sato, 1994; Jaeschke, 2006). Todavia, a presença desses no desenvolvimento das lesões hepáticas associadas ao consumo de determinado nutriente ou sobrecarga do mesmo ainda está sob investigação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento Experimental

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais com aprovação do comitê de ética na mesma universidade, protocolo nº 060/2010 (**Anexo A**). Foram utilizados camundongos com seis semanas de vida, da linhagem BALB/c. Os animais foram divididos em dois grupos, alimentados com dieta controle (C) (4,0 kcal/g de ração) ou rica em carboidratos refinados (HC) (4,4 kcal/g de ração). A **Tabela 1** apresenta a porcentagem de calorias provenientes dos macronutrientes da dieta controle e da dieta rica em carboidratos refinados utilizada nesse trabalho.

A dieta rica em carboidratos refinados contém leite condensado (40%), dieta comercial de roedores (40%), açúcar refinado (8%) e água (12%). Além disso, dentre a composição total de carboidratos 30% são sacarose.

**Tabela 1 - Composição nutricional das dietas controle (C) e rica em carboidratos refinados (HC)**

| Composição    | Dieta controle |       | Dieta HC   |       |
|---------------|----------------|-------|------------|-------|
|               | g%             | kcal% | g%         | kcal% |
| Proteínas     | 26,3           | 31,1  | 17,5       | 20    |
| Carboidratos  | 55,6           | 65,8  | 64,8       | 74,2  |
| Lipídios      | 2,6            | 3,1   | 5,0        | 5,8   |
| Fibras        | 6,2            | -     | 4,1        | -     |
| Minerais      | 9,3            | -     | 8,5        | -     |
| <b>kcal/g</b> | <b>4,0</b>     |       | <b>4,4</b> |       |

Os animais foram então re-divididos nos seguintes períodos experimentais: 1 e 3 dias, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas. Os camundongos foram mantidos em ambiente com controle de luz e temperatura; tiveram livre acesso à água e à dieta determinada. Os resultados apresentados dos animais controles referem-se à média dos valores nos diferentes tempos avaliados.

Após 12 horas de jejum, os animais submetidos à eutanásia e o fígado removido, pesado e armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso ou conservado em formol tamponado 4% para as análises histológicas. O sangue foi coletado e armazenado em tubos, centrifugado para a obtenção do soro e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para as dosagens metabólicas.



## **3.2 Metodologia**

### **3.2.1 Método de Folch e quantificação de lipídios**

Foram pesados 200 mg de fígado e homogeneizados em 10 mL de solução clorofórmio/metanol (2:1) permanecendo em repouso para extração. No dia seguinte, foi adicionada solução salina a 0,9% para separação da parte insolúvel na proporção de 2mL para 10mL do filtrado. Após a separação das fases, uma alíquota da parte clorofórmica foi transferida para recipiente previamente pesado e, realizada quantificação por gravimetria da gordura resultante do evaporado (Folch *et al.*, 1957). As concentrações de colesterol total e triglicérideo foram determinadas por meio de kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG) após a suspensão da gordura obtida anteriormente em 500 µL de isopropanol, em espectrofotômetro a 505 nm.

### **3.2.2 Dosagens sorológicas**

A determinação das concentrações de triglicérides e colesterol total no soro foi realizada por meio de kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG). A concentração das transaminases AST e ALT foi realizada por meio de kit colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG). Ambas foram determinadas em espectrofotômetro.

### **3.2.3 Lâmina histológica**

Primeiramente, foi realizada a fixação do tecido coletado no momento da eutanásia com formol 4% tamponado, sendo após o período de fixação (24 horas) conservado em álcool 70% para posterior utilização. As amostras foram submetidas à desidratação realizada em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III) permanecendo por período de 30 minutos em cada solução. Posteriormente, foi realizada a diafanização em que os tecidos foram banhados em xilol durante 1 hora. Os tecidos foram impregnados com parafina durante 1 hora e incluídos na mesma.

Os blocos de parafina, contendo os tecidos do fígado incluídos, foram cortados a 5  $\mu\text{m}$  por meio da microtomia. As colorações com H&E (Hematoxilina-Eosina) e tricrômico de Gomori foram utilizadas para avaliação morfológica e de fibras colágenas, respectivamente. As lâminas obtidas foram avaliadas em microscópio de luz, equipado com câmera digital (Moticam 2500). Para as análises histológicas do fígado, foi realizado o escore histológico, baseando-se nos seguintes parâmetros para quantificação dos resultados: hiperemia, infiltrado inflamatório, inflamação perivascular e esteatose (0 – ausente; 1 – leve; 2 – moderado; 3 – grave), adaptado de Brunt et al. (1999) de acordo com as principais alterações hepáticas observadas nos camundongos. Para a quantificação da área de colágeno foram obtidos no mínimo 10 campos aleatórios (100x), de cada animal, para a determinação da área verde em  $\mu\text{m}^2$  mensurada no software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA), adaptado as análises do fígado do que foi descrito anteriormente (Russo *et al.*, 2009).

### **3.2.4 Microscopia intravital**

Em experimento complementar, camundongos C57BL/6J Lysm-eGFP (eGFP-expressando neutrófilos) foram alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) durante 3 dias, 8 e 12 semanas para a realização da técnica de microscopia intravital conforme previamente descrita (Marques *et al.*, 2012). Os animais foram anestesiados com ketamina (130 mg/kg) e xylazina (0,3 mg/kg) e o fígado exposto. Foi administrada via i.v. solução de rodamina 6G (1,5mg/kg de peso corporal; Sigma, St. Louis, MO) para marcação da estrutura hepática. A microcirculação foi visualizada sobre microscópio confocal usando-se escaneador Olympus Fluoview FV300 equipado com laser de argônio a 488 nm. Todas as imagens foram adquiridas usando-se lente objetiva de 3x e, foi realizada média do número de neutrófilos observados de no mínimo três campos aleatórios para cada animal.

### 3.2.5 Extração de citocinas dos tecidos

Fragmentsos do fígado foram macerados em homogeneizador na presença de 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,89g diluídos em 1 litro de água destilada). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm e 4<sup>o</sup>C e o infranadante foi recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

### 3.2.6 Determinação de citocinas por ELISA

Para a quantificação das citocinas no fígado foram utilizados kits DuoSet de ELISA (Enzyme Linked ImmuneSorbent Assay) para TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-13 e CXCL1. Foram seguidas as instruções do fabricante para a realização dos ensaios (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) em placas de 96 poços (C96 MicroWellTM Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

As concentrações das citocinas foram avaliadas em diluição 1:10 para o homogenato do fígado em solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Foram adicionados 100  $\mu$ L de solução por poço na concentração adequada do anticorpo de captura específico de cada citocina. A placa contendo a solução com o anticorpo de captura permaneceu à temperatura de 4<sup>o</sup>C em local úmido e protegido da luz até o dia seguinte, após o período, cada poço foi lavado 3 vezes com solução PBS/Tween 0,1%. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA). O tempo de bloqueio foi de uma hora e a placa foi novamente lavada. Foram adicionados as amostras e os padrões de citocinas a partir de concentrações decrescentes, sendo assim formada a curva padrão. As placas foram incubadas até o dia seguinte nas mesmas condições anteriores. A placa foi lavada e adicionado 100  $\mu$ L da solução com anticorpo de detecção em cada poço da placa. A placa foi incubada por duas horas. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa, solução contendo estreptavidina. Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o

tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria a 490 nm.

### **3.2.7 PCR em Tempo Real (RT-PCR)**

#### **3.2.7.1 Extração do RNA total**

O RNA total foi isolado do fígado pelo reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante. Segue-se o procedimento com o RNA obtido e colocado em microtubos de 2 mL adicionado de 200 µL de Clorofórmio (Merck), sendo a solução vigorosamente agitada até adquirir coloração rosa clara. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm e 4°C. A fase incolor situada na parte superior do tubo foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 500 µL Isopropanol (Merck). O tubo foi homogeneizado gentilmente e novamente centrifugado como nas condições anteriores. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µL de álcool 70%. O tubo foi novamente centrifugado por 3 minutos nas mesmas configurações que as anteriores. Foi descartado o sobrenadante e após seco à temperatura ambiente o precipitado formado foi resuspenso em 20 µL de água ultra pura DEPC. A suspensão foi dissolvida em banho Maria a 65°C por 10 minutos.

Após a extração, os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA) e armazenados a -80°C.

#### **3.2.7.2 Síntese de DNAc**

Para a confecção das moléculas de DNAc (fita de DNA complementar) por RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), foram utilizados 2,0 µg de RNA total. O RNA foi então submetido à ação da enzima SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme as condições indicadas pelo fabricante. Em cerca de 2,0 µg de RNA total (10 µL) foi

adicionado 1  $\mu\text{L}$  de primer Oligo (dT) (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  água DEPC. Essa solução foi incubada a 70°C durante 5 minutos e após, por um período de 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de GeneAmp® 10X PCR Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de UltraPure™ Dithiothreitol (DTT) (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1  $\mu\text{L}$  de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/L) e 1  $\mu\text{L}$  de da enzima SuperScript III (200 U/L) seguido de incubação por 1 hora e 30 minutos a 42°C, subindo para 70°C por 15 minutos. Ao final, as amostras de DNAc foram armazenadas a -20°C, anterior à reação de PCR, específica para cada gene.

### 3.2.7.3 Reação de PCR em tempo real

As reações foram realizadas em placas de 96 poços MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, cobertas com adesivos ópticos e processadas pela máquina 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, RU). Foi utilizado o sistema de quantificação por fluorescência SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para tal, foram utilizadas amostras de DNAc diluídas 1:10 em água DEPC, com concentração final de 200 ng/ $\mu\text{L}$ . A análise de cada amostra foi em duplicata, sendo que a cada poço foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  da amostra associada ao mix contendo 5  $\mu\text{L}$  SYBR Green, 2  $\mu\text{L}$  água DEPC, 1  $\mu\text{L}$  oligonucleotídeo senso e 1  $\mu\text{L}$  oligonucleotídeo anti-senso. O branco (NTC) foi considerado como tudo menos a amostra. A **Tabela 2** mostra as sequências dos oligonucleotídeos que foram utilizados na reação.

As condições da reação de PCR em tempo real foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Os valores médios de medições em duplicata do Ct (ciclo limiar) foram usados para calcular a expressão do gene alvo, com normalização de um gene da proteína mitocondrial (18s) de todas as amostras, utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

**Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos para as reações de PCR em Tempo Real**

| <b>Gene</b> | <b>Oligonucleotídeo senso</b>      | <b>Oligonucleotídeo anti-senso</b> |
|-------------|------------------------------------|------------------------------------|
| ChREBP      | 5' GCATCCTCATCCGACCTTTA 3'         | 5' GATGCTTGTGGAAGTGCTGA 3'         |
| SREPB-1     | 5' AAGCAAATCACTGAAGGACCTGG 3'      | 5' AAAGACAAGGGGCTACTCTGGGAG 3'     |
| SREBP-2     | 5' AAAATCATAGAGTTGAAGGACTTAGTCA 3' | 5' TGTAATCAATGGCCTTCCTCAGA 3'      |
| 18s         | 5' CGTTCCACCAACTAAGAACG 3'         | 5' CTCAACACGGGAAACCTCAC 3'         |

### **3.3 Análise estatística**

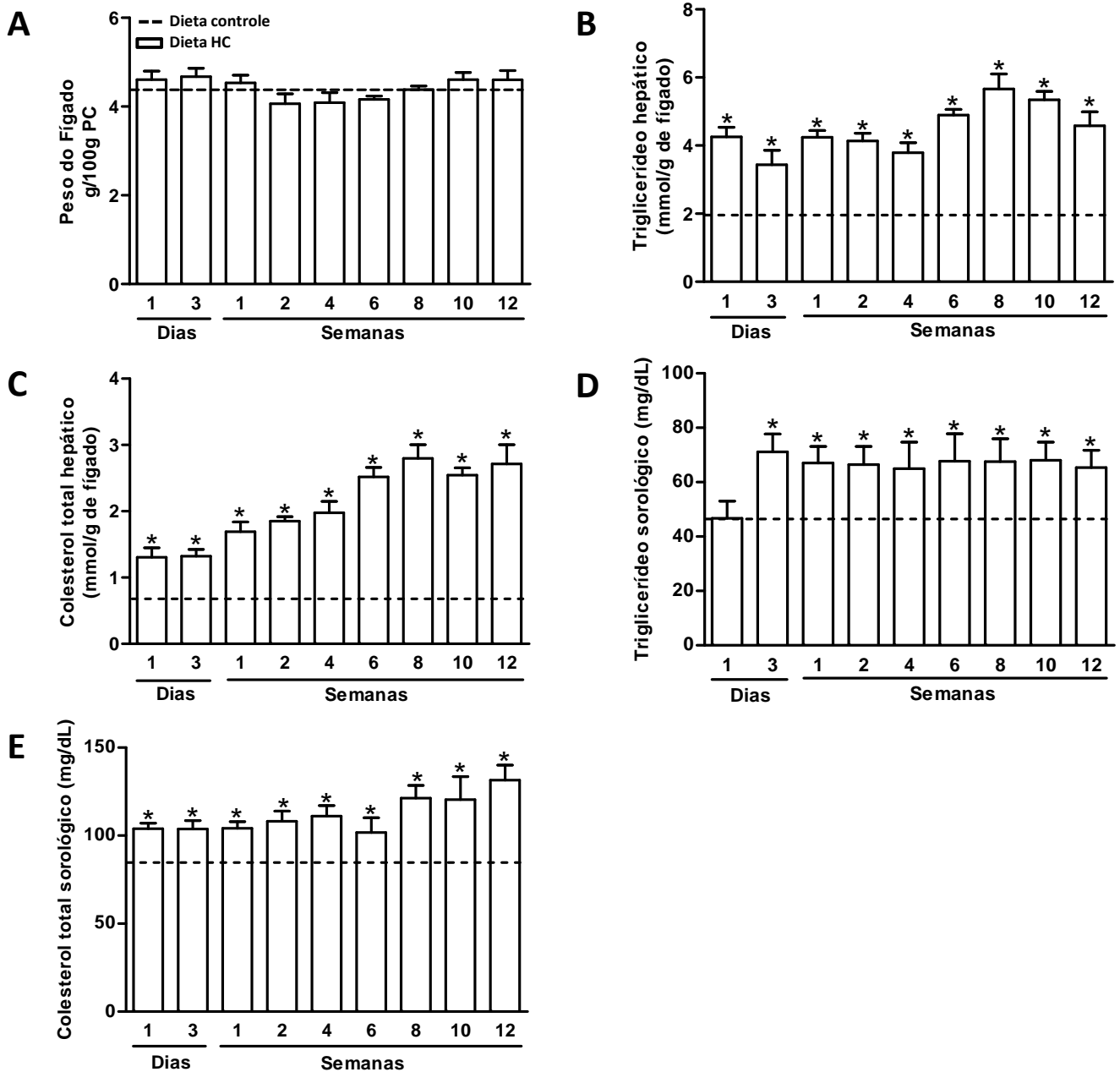
Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, as comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de Dunnett. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil lipídico hepático e sorológico de camundongos alimentados com dieta HC

Conforme registrado na **Figura 4**, os camundongos alimentados com dieta HC não apresentaram alteração no peso do fígado em nenhum dos tempos avaliados quando comparados ao grupo controle (**Figura 4A**). Em relação ao conteúdo lipídico hepático, houve aumento na concentração de triglicerídeos e colesterol no fígado dos animais alimentados com dieta HC em todos os tempos avaliados (**Figura 4B e C**).

A concentração sorológica de triglicerídeos aumentou após 3 dias de consumo da dieta HC, e manteve-se elevada até a 12<sup>a</sup> semana (**Figura 4D**). A concentração de colesterol foi maior nos animais alimentados com dieta HC em todos os períodos avaliados (**Figura 4E**).

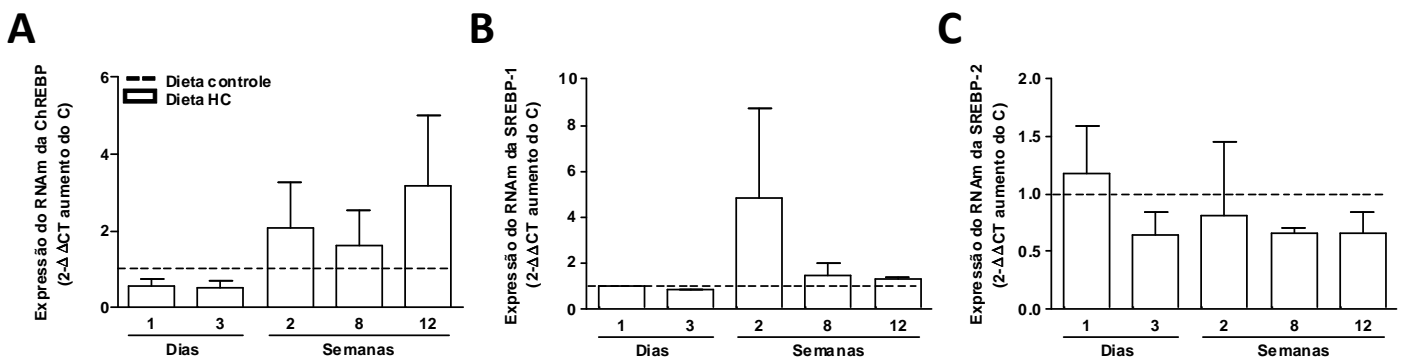


**Figura 4** - Perfil lipídico hepático e sorológico em camundongos alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) ao longo do tempo. (A) Peso do fígado em relação a 100 g de peso corporal (PC), (B) conteúdo hepático de triglicerídeos e (C) colesterol total e concentração sorológica de (D) triglicerídeos e (E) colesterol total. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5-6$ ), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P<0,05$  vs. dieta controle).



## 4.2 Expressão gênica dos fatores de transcrição associados à lipogênese

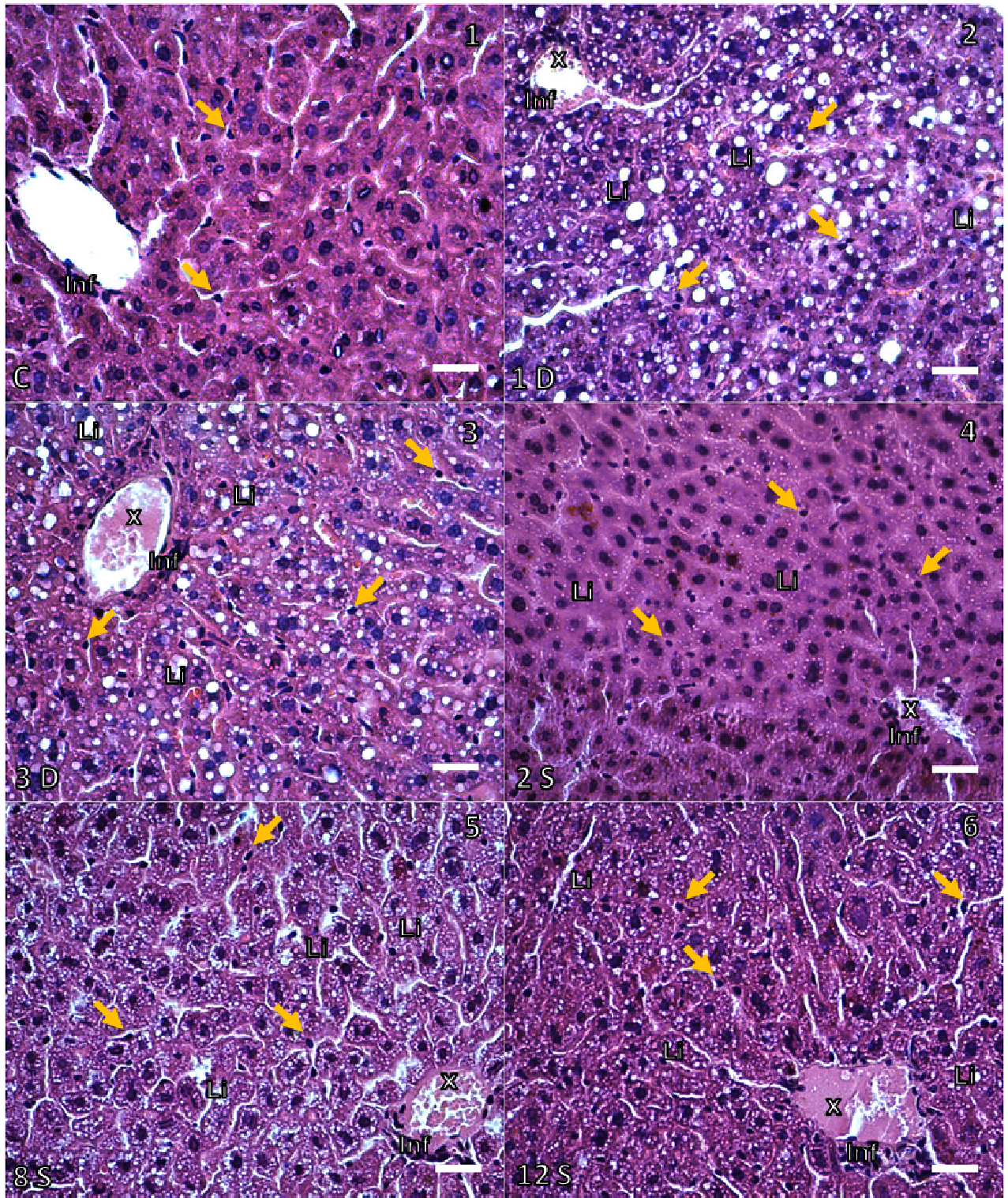
A expressão gênica do RNAm dos fatores de transcrição ChREBP, SREBP-1 e SREBP-2, relacionados à ativação de enzimas lipogênicas, estão apresentadas na **Figura 5**. Em nenhum dos tempos avaliados foi observada alteração na expressão do RNAm de ChREBP (**Figura 5A**), SREBP-1 (**Figura 5B**) e SREBP-2 (**Figura 5C**) em animais alimentados com dieta HC.



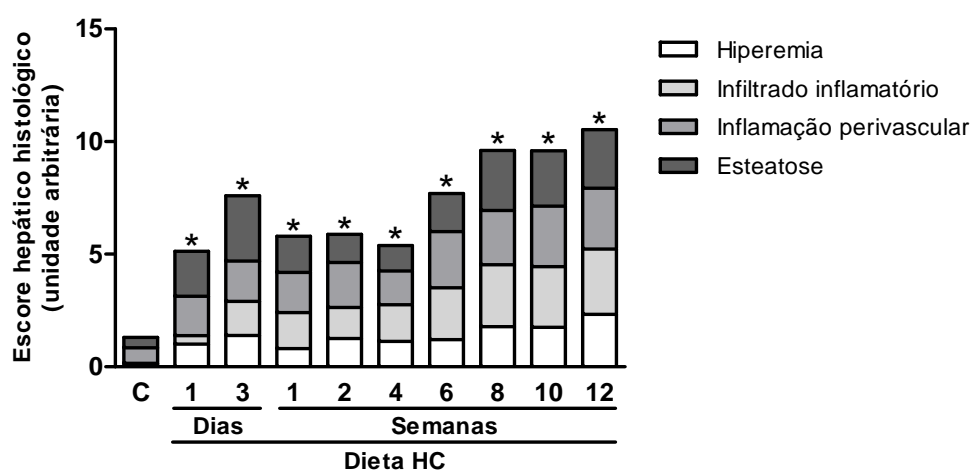
**Figura 5** – Expressão do RNAm para os fatores de transcrição (A) ChREBP, (B) SREBP-1 e (C) SREBP-2 de animais alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) ao longo do tempo. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=3-4), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P < 0,05$  vs. dieta controle).

### 4.3 Análise morfológica hepática

A **Figura 6 e 7** mostram a morfologia representativa dos cortes histológicos (**Figura 6**) e o escore patológico (**Figura 7**) do tecido hepático dos camundongos alimentados com dieta controle e HC nos diferentes tempos. Os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento de hiperemia (x) em todos os tempos avaliados (**Figura 6 e 7**). O infiltrado inflamatório (setas) apresentou-se aumentado nos animais alimentados com dieta HC quando comparados ao grupo controle (**Figura 6**). O consumo de dieta HC por 1 dia induziu aumento na presença de leucócitos nos sinusóides hepáticos que se manteve em todos os outros tempos analisados. Destaca-se que foi observado maior influxo nos últimos tempos avaliados (**Figura 7**). A inflamação apresentada na parede dos vasos hepáticos (Inf) aumentou ao longo do tempo em intensidade nos animais alimentados com dieta HC. A partir de 1 dia de dieta (**Figura 6 – Painel 2**) foi observado aumento na camada de células ao redor do vaso culminando em inflamação mais grave nos animais alimentados com dieta HC após 6 semanas (**Figura 7**). Com relação às gotas lipídicas (Li), a presença das mesmas é bem marcante em animais alimentados por 1 e 3 dias de dieta HC, apresentando esteatose macrovesicular (**Figura 6 – Painel 2 e 3**), sendo que, posterior a esses períodos de avaliação, tornou-se microvesicular (**Figura 6 – Painel 4-6**) e mais intensa a partir da 6ª semana com dieta HC (**Figura 7**).



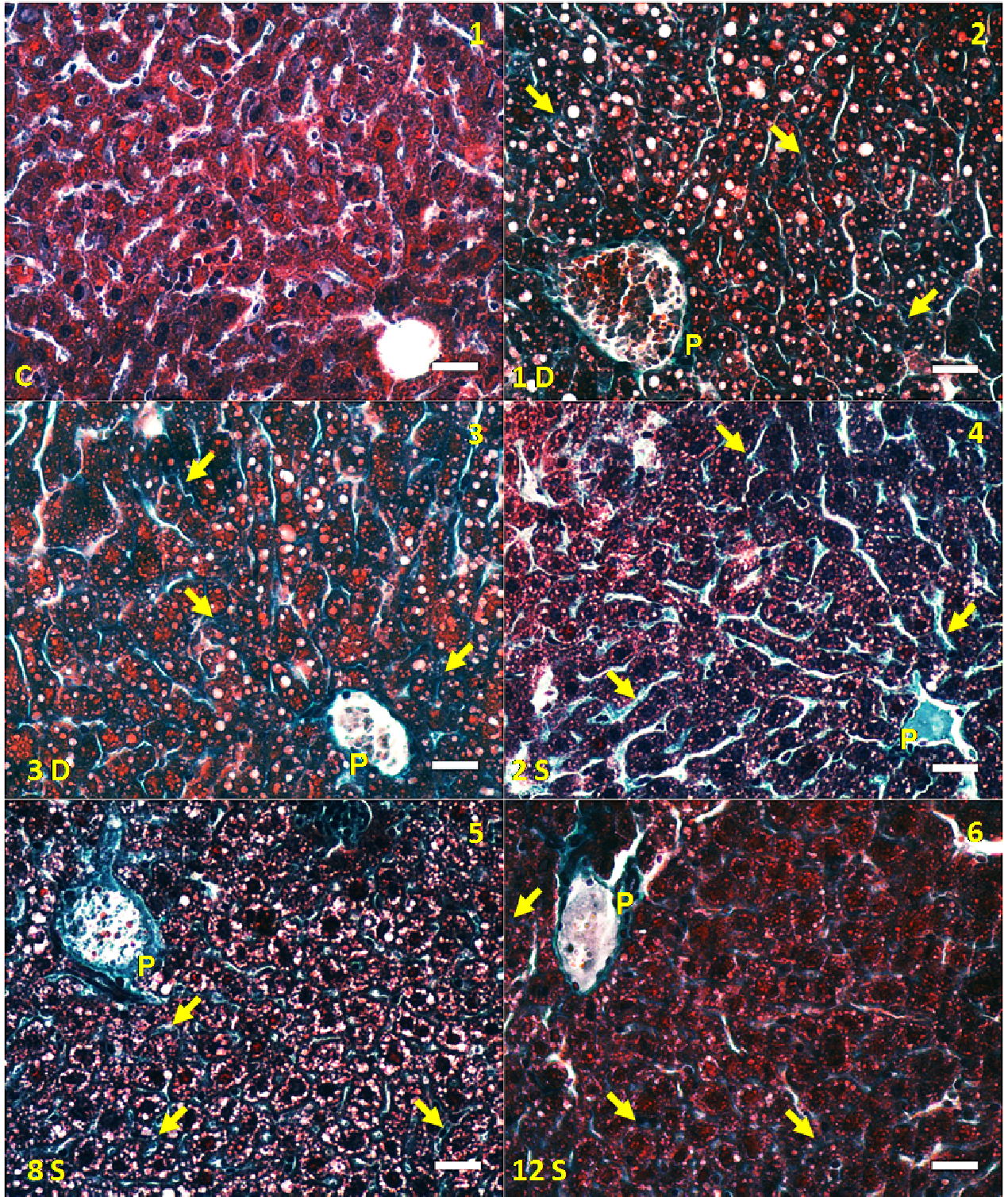
**Figura 6** – Análise morfológica do tecido hepático. Figuras representativas da morfologia com hematoxilina-eosina de amostras do fígado (x200) de animais alimentados com dieta controle (Painel 1) e HC por 1 (Painel 2) e 3 (Painel 3) dias, 2 (Painel 4), 8 (Painel 5) e 12 (Painel 6) semanas. As barras indicam 25 μm. Observe-se hiperemia (x); infiltrado inflamatório (setas); inflamação no vaso (Inf); gotas lipídicas (Li) (n=6-8).



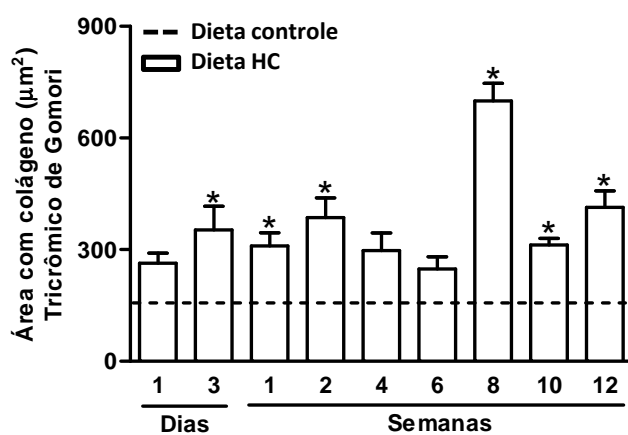
**Figura 7** – Análise morfológica do tecido hepático. Escore estratificado conforme a hiperemia, o infiltrado inflamatório, a inflamação perivascular e a esteatose da morfologia hepática de camundongos com dieta controle (C) ou rica em carboidratos refinados (HC). As barras representam os valores médios (n=6-8), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P < 0,05$  vs. dieta controle).

#### 4.4 Análise hepática da deposição de colágeno

Na **Figura 8** e **9** está representada a morfologia hepática dos cortes histológicos corados com Tricrômico de Gomori (**Figura 8**) e quantificação da área verde correspondente às fibras colágenas presente nos mesmos (**Figura 9**) de animais controle e alimentados com dieta HC por diferentes períodos. Os animais alimentados com dieta HC, no geral, apresentaram deposição de colágeno em todos os tempos quando comparados ao controle, tanto no parênquima hepático (setas) quanto perivascular (P). Após 1 dia de dieta HC foi observada leve deposição perivascular e no parênquima (**Figura 8 – Painel 2**), sem diferença significativa na quantificação da área de colágeno quando comparado com o controle (**Figura 9**). Nos tempos 3 dias, 1 e 2 semanas, em relação ao controle, houve aumento significativo na área de colágeno (**Figura 9**), além de ser observado a presença de colágeno perivascular e no parênquima de forma moderada (**Figura 8 – Painel 3 e 4**). Contudo, com 4 e 6 semanas a deposição de colágeno, principalmente no parênquima parece regredir, pois não foi observada diferença na área de colágeno ao comparar com o controle (**Figura 9**). Na 8<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana, os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento no depósito de colágeno em relação ao grupo controle (**Figura 9**), dentre estes se destaca o grupo alimentado com 8 semanas que apresentou uma área de colágeno intensa tanto perivascular quanto no parênquima (**Figura 8 – Painel 5 e Figura 9**), enquanto os tempos de 10 e 12 semanas demonstraram regressão se comparados ao tempo de 8 semanas (**Figura 8 – Painel 6 e Figura 9**).



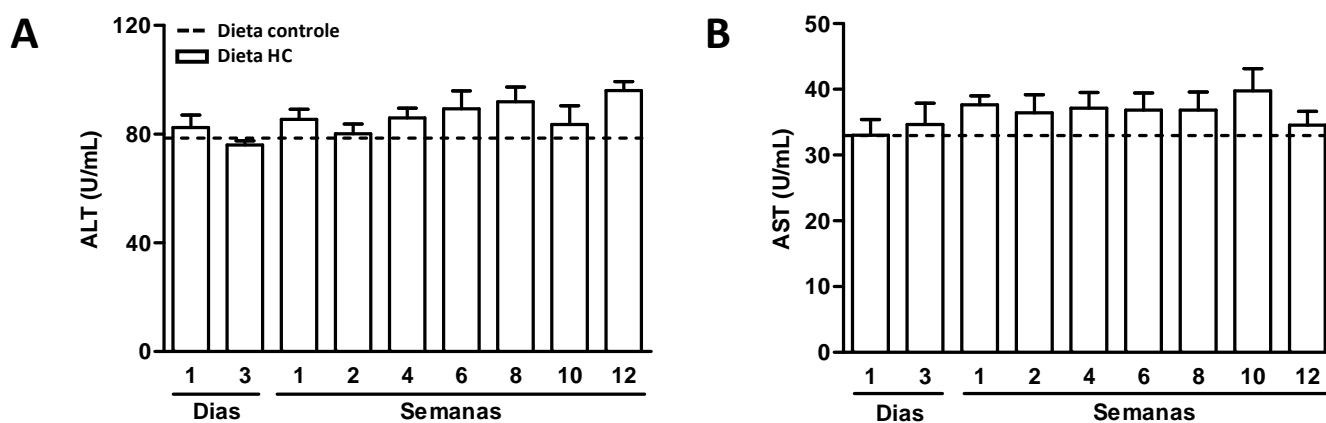
**Figura 8** – Análise da deposição de colágeno no tecido hepático. Gráficos representativos da coloração com Tricrômico de Gomori de amostras do fígado (x200) de animais alimentados com dieta controle (Painel 1) e HC por 1 (Painel 2) e 3 (Painel 3) dias, 2 (Painel 4), 8 (Painel 5) e 12 (Painel 6) semanas. As barras indicam 25  $\mu$ m. As áreas verdes indicam a deposição de colágeno (setas) no parênquima e (P) perivascular.



**Figura 9** – Análise da deposição de colágeno no tecido hepático. Quantificação da área verde em  $\mu\text{m}^2$  de camundongos com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC). As barras representam os valores médios ( $n=6-8$ ), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P<0,05$  vs. dieta controle).

#### 4.5 Concentração sorológica das transaminases ALT e AST

A concentração das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), marcadoras de função hepática, está mostrada na **Figura 10**. Como pode ser observado, não houve alteração, em nenhum dos tempos avaliados, na concentração de ambas as enzimas nos animais alimentados com dieta HC.



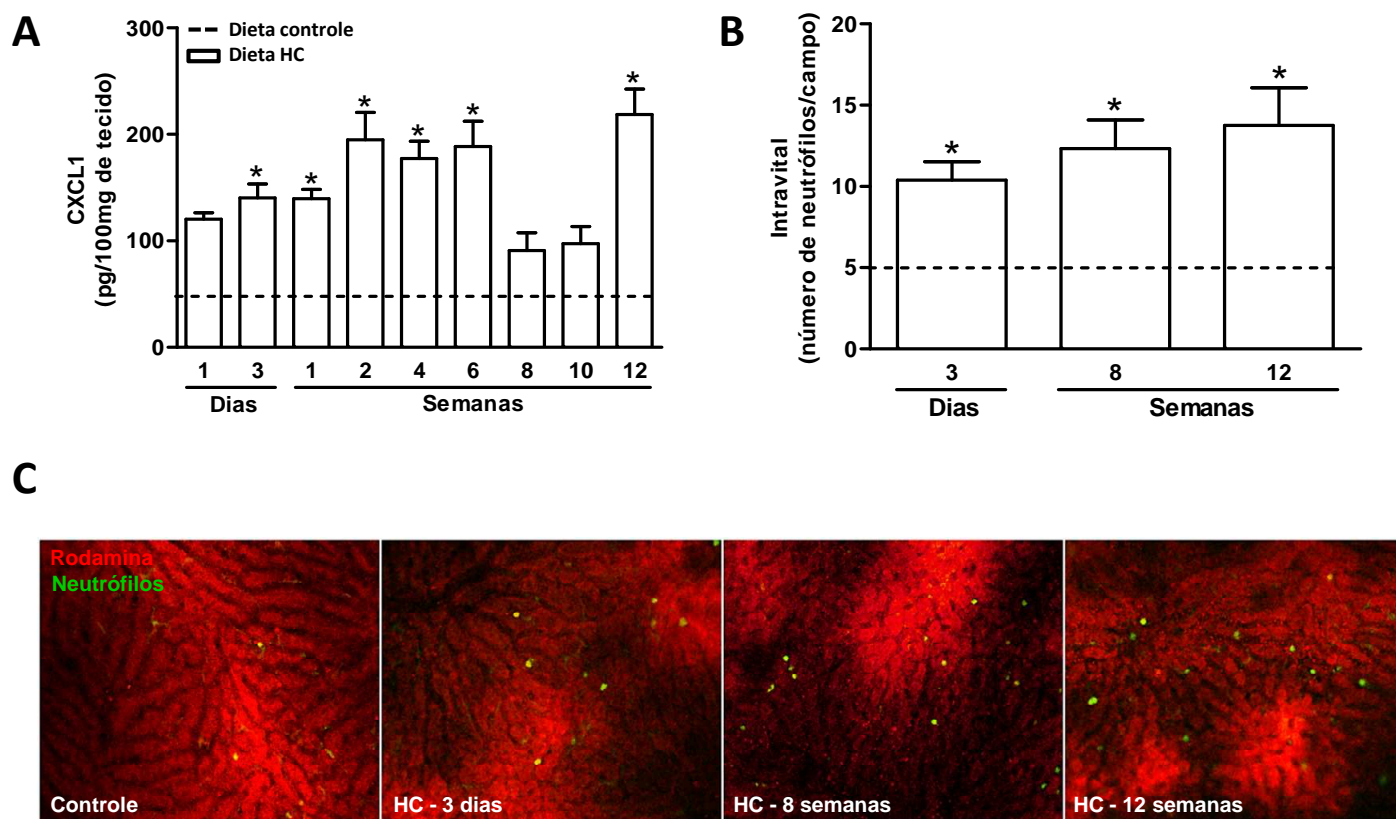
**Figura 10** – Concentração das enzimas (A) alanina aminotransferase (ALT) e (B) aspartato aminotransferase (AST) em animais alimentados com dieta controle (C) ou rica em carboidratos refinados (HC) ao longo do tempo. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=6-7).



#### **4.6 Infiltração de neutrófilos no fígado dos animais alimentados com as diferentes dietas**

A concentração hepática da quimiocina CXCL1 nos animais alimentados com dieta HC apresentou-se variável nos diferentes períodos avaliados. Essa quimiocina, quimioatraente para neutrófilos, encontrou-se aumentada a partir do 3<sup>o</sup> dia e manteve-se elevada até a 6<sup>a</sup> semana. Houve redução da concentração da CXCL1 na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana, sendo que, na 12<sup>a</sup> semana a concentração da mesma elevou-se novamente em relação aos animais controle (**Figura 11A**).

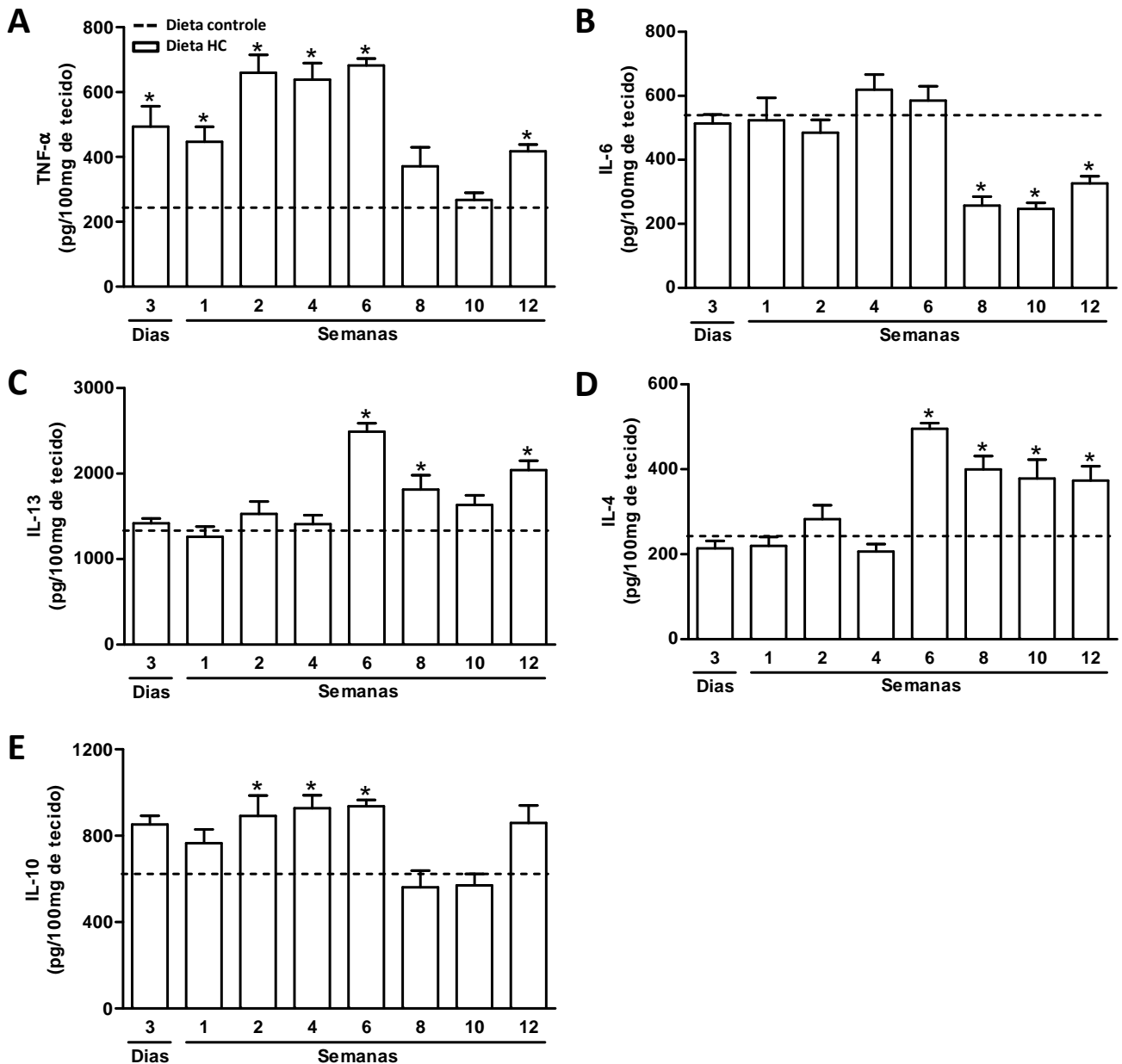
Para verificar se o aumento da quimiocina CXCL1 foi acompanhada pelo aumento do influxo de neutrófilo para o fígado utilizamos animais C57BL/6J Lysm-eGFP (eGFP-expressando neutrófilos) e avaliamos o recrutamento dos neutrófilos por microscopia intravital (**Figura 11B e C**). Os animais alimentados com dieta HC por 3 dias, 8 e 12 semanas apresentaram aumento significativo no número de neutrófilos acumulados nos sinusóides hepáticos (**Figura 11B**), como pode ser observado também nas fotos representativas (**Figura 11C**).



**Figura 11** – (A) Concentração hepática da proteína quimioatraente para neutrófilos CXCL1 por ELISA de camundongos alimentados com dieta controle e HC. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6-8$ ), \*diferem estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P<0,05$  vs. dieta controle). (B) quantificação hepática de neutrófilos acumulados em camundongos C57BL/6J Lysm-eGFP e (C) imagem realizada na microscopia intravital dos mesmos animais quando alimentados com dieta controle e rica em carboidratos refinados (HC) por 3 dias, 8 e 12 semanas. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média ( $n=3-5$ ), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P<0,05$  vs. dieta controle).

#### **4.7 Concentração das citocinas no fígado de camundongos alimentados com dieta HC**

A **Figura 12** mostra a concentração hepática das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (**Figura 12A**) e IL-6 (**Figura 12B**). A concentração de TNF- $\alpha$  aumentou após 3 dias do consumo da dieta HC e manteve-se elevada até a 6<sup>a</sup> semana em relação aos animais controles. Houve redução dessa citocina na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana com posterior aumento na 12<sup>a</sup> semana. Por outro lado, a citocina IL-6 apresentou-se reduzida após 8 semanas mantendo-se em menor concentração até a 12<sup>a</sup> semana quando comparada aos animais controles. Com relação às citocinas anti-inflamatórias, a concentração da IL-13 (**Figura 12C**) e IL-4 (**Figura 12D**) apresenta perfil semelhante, sendo observado aumento significativo somente a partir da 6<sup>a</sup> semana, e permanecendo aumentadas até o final do período experimental quando comparada aos animais controles. A concentração da citocina IL-10 (**Figura 12E**) apresentou-se elevada na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana nos animais alimentados com dieta HC.



**Figura 12** – Concentração hepática das citocinas (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-13, (D) IL-4 e (E) IL-10 avaliadas por ELISA em animais alimentados com dieta controle ou rica em carboidratos refinados (HC) nos diferentes tempos. As barras representam os valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=6-8), \*difere estatisticamente pelo ANOVA one-way com post hoc o teste Dunnett ( $P < 0,05$  vs. dieta controle).

## 5 DISCUSSÃO

A esteatose hepática é agravo que pode ser induzido por vários fatores, dos quais se encontram a obesidade e o consumo de diferentes composições dietéticas (Feldstein *et al.*, 2003; Vansaun *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2011). No presente trabalho, o consumo de dieta rica em carboidratos refinados induziu: (i) aumento agudo (1-3 dias) no conteúdo de gordura hepática que se manteve até 12<sup>a</sup> semana, com consequente alteração morfológica, evidente no escore histopatológico, sem, no entanto, causar alteração na função hepática; (ii) alterações metabólicas sistêmicas agudas e crônicas demonstradas pelo desenvolvimento de dislipidemia; (iii) deposição de colágeno no fígado em diferentes intensidades ao longo do tempo de ingestão da dieta; (iv) aumento agudo (3 dias) e sustentado na presença de neutrófilos na microvasculatura hepática, assim como alteração na concentração de citocinas no órgão.

O acúmulo de lipídios no fígado é determinado pelas seguintes vias metabólicas: lipogênese, que consiste na síntese *de novo* de ácidos graxos com consequente reesterificação a triglicerídeos; influxo de ácidos graxos oriundos da lipólise dos lipídios armazenados no tecido adiposo; e captação de ácidos graxos derivados de triglicerídeos presentes em lipoproteínas circulantes (Postic e Girard, 2008). O consumo de dieta rica em carboidratos determinou acúmulo de gordura nos hepatócitos dos animais alimentados em curto- (1 e 3 dias) e longo-prazo, assim como aumento de triglicerídeos e colesterol circulantes. Em curto-prazo, as gotas lipídicas nos hepatócitos apresentaram-se como macrovesículas ao passo que em longo-prazo microvesiculares (a partir da 1<sup>a</sup> semana). A macroesteatose é descrita como benigna e reversível, sendo resultante do desequilíbrio entre a síntese de lipídios e a exportação dos hepatócitos (Tannapfel *et al.*, 2011). Por outro lado, a microesteatose é considerada maligna, e correlaciona-se com alterações histológicas mais avançadas presentes na DHGNA (Tandra *et al.*, 2011). Os triglicerídeos, seguidos do colesterol, representam o maior conteúdo lipídico hepático (Nelson, 1962). No presente trabalho os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento, a partir do 1<sup>o</sup> dia permanecendo até o final do período experimental, do conteúdo hepático de triglicerídeos e colesterol. De fato, a análise

do conteúdo lipídico do fígado é condizente com a avaliação morfológica e visualização expressiva das gotas lipídicas.

A esteatose hepática e a dislipidemia são eventos comuns em portadores de sobrepeso e obesidade, e estão presentes no diabetes tipo 2 e na aterosclerose (Despres, 1998; Carr e Brunzell, 2004). No jejum, o aumento da concentração de triglicerídeos e colesterol no soro é indicativo de maior exportação hepática na forma de VLDL (Taghibiglou *et al.*, 2000) e conseqüentemente maior formação de LDL (Zhang *et al.*, 1992; Groot *et al.*, 1996). Estudos prévios demonstraram que o consumo de dieta rica em carboidratos (Parks *et al.*, 1999; Mittendorfer e Sidossis, 2001; Roberts *et al.*, 2008) e sacarose (Cahova *et al.*, 2012) causam alteração no metabolismo de lipídios por induzir menor oxidação de ácidos graxos, aumento da secreção hepática de triglicerídeos e síntese *de novo* de ácidos graxos, além do aumento de colesterol (Srinivasan *et al.*, 1979; Chen *et al.*, 2011). Fatores importantes contribuintes dessas alterações incluem o aumento da disponibilidade de glicose dietética como substrato (Durrington *et al.*, 1982; Boogaerts *et al.*, 1984) e também a modulação na expressão de genes envolvidos no controle da síntese de lipídios.

Os fatores de transcrição ChREBP, SREBP-1 e SREBP-2, estão relacionados a síntese de enzimas envolvidas com a via lipogênica. Os dois primeiros estão associados à produção de triglicerídeos e o último à de colesterol (Horton *et al.*, 2002; Uyeda e Repa, 2006). Apesar de não ter sido observada alteração na expressão desses fatores de transcrição nos animais alimentados com dieta HC, o acúmulo hepático e o aumento circulante de triglicerídeos e colesterol foi evidente. Três fatores podem ser considerados quanto a não concordância na expressão dos fatores de transcrição e o conteúdo de triglicerídeos e colesterol: (1) o número de amostras utilizado para as análises é pequeno, podendo influenciar no resultado final; (2) a análise dos fatores de transcrição foi realizada no estado de jejum, período de menor expressão desses fatores. Já foi demonstrado que a expressão dos fatores de transcrição avaliados é regulada pelo estado alimentar dos animais. As expressões de ChREBP, SREBP-1 e SREBP-2 apresentam-se reduzidas no período de jejum e são estimuladas após a ingestão dos alimentos sendo que tanto

a hiperglicemia pós-prandial como a hipersecreção de insulina são fatores estimulantes para o aumento na expressão e atividade desses fatores de transcrição (Horton *et al.*, 1998; Engelking *et al.*, 2004); (3) o método utilizado, PCR em tempo real, realiza análise do transcriptoma presente nas células, não sendo indicativo direto do produto final sintetizado (Greenbaum *et al.*, 2003; Janevski *et al.*, 2012). Dessa forma, a regulação pós-transcricional pode ser fator importante determinante para o conteúdo e atividade das enzimas relacionadas à síntese de lipídios. Assim, é possível que a regulação e atividade das vias associadas à lipogênese podem estar mais ativas no período pós-absortivo não sendo identificado aumento na expressão dos fatores de transcrição no estado de jejum.

As doenças hepáticas de origem não alcoólica caracterizam-se tanto pela deposição de gordura nos hepatócitos quanto pela presença de infiltrado de células imunológicas no fígado (Syn *et al.*, 2010; Inzaugarat *et al.*, 2011). No presente estudo, o acúmulo agudo e sustentado de gordura hepática nos camundongos alimentados com dieta HC também foi acompanhado por aumento da infiltração de neutrófilos, do escore histopatológico, da deposição de colágeno no parênquima hepático e perivascular além de alteração no perfil das citocinas. Na análise histológica, foi observado infiltrado inflamatório no parênquima hepático e perivascular nos animais alimentados com dieta HC em diferentes intensidades; caracterizado nos últimos períodos como mais grave em quantidade e extensão. A inflamação hepática foi identificada em dois locais, no parênquima e/ou perivascular. A inflamação no parênquima compreende uma população de células mista incluindo neutrófilos, linfócitos (principalmente células T CD3+), células de Kupffer (macrófagos) (Lefkowitz *et al.*, 2002) e as NKT (Syn *et al.*, 2010). Já a inflamação perivascular compõe-se principalmente de células de Kupffer (Lefkowitz *et al.*, 2002), e está associada à fibrose e obstrução dos vasos por deposição de tecido conjuntivo (Tannapfel *et al.*, 2011).

Concomitante a avaliação morfológica do infiltrado inflamatório no fígado observamos influxo aumentado de neutrófilos nos sinusóides hepáticos após 3 dias, 8 e 12 semanas do consumo de dieta HC. Além disso, houve aumento agudo e transiente da quimiocina CXCL1. Dentre os fatores envolvidos no recrutamento de

neutrófilos para o fígado ressalta-se a presença de quimiocinas, que são agentes quimiotáticos potentes, e citocinas como TNF- $\alpha$  e a IL-6, produzidos em resposta à ativação de células imunológicas (Park *et al.*, 2010). Em camundongos as principais quimiocinas para neutrófilos são: CXCL1, CXCL2 e CXCL5 (Williams *et al.*, 2011). De fato, Lisbonne *et al.* (2011) demonstraram que a CXCL1 apresenta importante papel no recrutamento hepático de neutrófilos por ocorrer aumento dessa quimiocina concomitante com a infiltração dessas células. Entretanto, o efeito pode também ser independente da quimiotaxia de neutrófilos, sendo associado à fibrogênese, necrose e contribuidor da falência hepática (Stefanovic *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2009).

A presença de neutrófilos nas doenças hepáticas ocorre em decorrência dos processos inflamatórios associados (Jaeschke e Smith, 1997; Bautista, 2002) e tem como objetivo a eliminação dos agentes responsáveis pela ativação e resolução da inflamação (Jaeschke e Hasegawa, 2006). Contudo, pode também contribuir para agravar as lesões iniciais e causar danos hepáticos adicionais (Jaeschke, 2006). A associação entre lesões hepáticas e o aumento do infiltrado de neutrófilos foi demonstrada em alguns modelos experimentais (Jaeschke e Farhood, 1991; Jaeschke *et al.*, 1991; Gonzalez-Flecha *et al.*, 1993). O recrutamento contínuo de neutrófilos para o fígado resulta em lesões por meio da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS); gerando um estado de estresse oxidativo nos hepatócitos e, como consequência, morte por necrose. Neutrófilos, ao serem recrutados até aos tecidos, encontram-se num estado de ativação superior a neutrófilos que circulam na corrente sanguínea (Sorensen *et al.*, 2001). Além disso, diferentes populações de neutrófilos, com características distintas, têm sido demonstradas. Esses neutrófilos podem se distinguir entre pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, sendo cada estado associado à produção de citocinas específicas e determinante para a ativação de macrófagos nos perfis classicamente ativado (pró-inflamatório) ou alternativamente ativado (anti-inflamatório) (Tsuda *et al.*, 2004). A presença de neutrófilos no sítio inflamatório pode ocasionar dano hepático em associação à citocina TNF- $\alpha$  (Hewett *et al.*, 1992; Hewett *et al.*, 1993) e consequente produção de ROS (Jaeschke, 2000). Por outro lado, a participação de neutrófilos em apoptose na resolução da inflamação, já foi demonstrada por meio da redução da quantidade de quimiocinas presentes no sítio inflamatório (Ariel *et al.*, 2006) e aumento de IL-10 (Byrne e Reen, 2002).



Tem sido descrito na literatura que a alteração na concentração das adipocitocinas, decorrente da expansão do tecido adiposo, também pode estar envolvida na modulação do recrutamento de neutrófilos. Trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (Oliveira *et al.*, 2012) demonstrou que os animais alimentados com dieta HC apresentam alteração na concentração sistêmica de leptina, adiponectina e resistina. Desta forma, sugere-se que tais adipocitocinas também possam estar envolvidas na associação entre metabolismo e função imunológica hepática. A leptina pode estimular a quimiotaxia de neutrófilos, contribuindo com migração dos mesmos *in vitro* (Caldefie-Chezet *et al.*, 2003; Montecucco *et al.*, 2006). A resistina parece interferir no movimento quimiotático de células polimorfonucleares (Cohen *et al.*, 2008). Em contrapartida, a redução de adiponectina está relacionada à elevação da atividade neutrofílica periférica (Trellakis *et al.*, 2012), além da atuação *in vitro* como inibidora da geração de ROS por neutrófilos (Magalang *et al.*, 2006). Os camundongos alimentados com dieta HC apresentaram aumento de leptina em todos os tempos, aumento agudo de resistina (1-3 dias) e redução de adiponectina a partir da 4ª semana (Oliveira *et al.*, 2012). Esses fatores podem ter contribuído com o aumento do influxo de neutrófilos para o fígado, tendo em vista as alterações ocasionadas pela dieta nesses animais. Apesar de haver evidências da participação das adipocitocinas no recrutamento e ativação de células imunológicas, investigações mais aprofundadas são necessárias para se definir melhor tal inter-relação.

A participação dos neutrófilos, na ocorrência da intolerância à glicose e alterações metabólicas induzidas pela obesidade, tem sido recentemente reportada (Talukdar *et al.*, 2012; Mansuy-Aubert *et al.*, 2013). Entretanto, o sítio metabólico avaliado quanto à presença dos neutrófilos inclui principalmente o tecido adiposo. Trabalho anterior demonstrou aumento do marcador para neutrófilos (GR1+) nas células do estroma vascular do tecido adiposo de animais alimentados por 3 dias com dieta rica em carboidratos refinados (Oliveira *et al.*, 2012). A evidência da presença de neutrófilos no tecido adiposo na obesidade sugere que essas células podem ser consideradas como participantes ativas no desenvolvimento da inflamação na obesidade e resistência à insulina (Talukdar *et al.*, 2012). Apesar do recrutamento dos neutrófilos para o tecido adiposo na obesidade ter sido previamente demonstrado, como

mencionado acima, o influxo dessas células para o fígado e a participação dos mesmos na patogênese da DHGNA e EHNA ainda permanecem desconhecidos.

Outro fator observado, no fígado dos camundongos alimentados com dieta HC, foi a deposição de colágeno, sendo que a participação das células imunológicas na mesma e ocorrência de fibrose ainda não é bem definida. Dentre essas, os neutrófilos parecem causar pouca influência na fibrose hepática em modelo experimental de obstrução do ducto biliar (Saito *et al.*, 2003). Entretanto, as células de Kupffer se encontram relacionadas com desenvolvimento da fibrose por lesão celular, pois essas células quando ativadas são responsáveis pela produção de citocinas e outros mediadores (Tsukamoto *et al.*, 1995; Luckey e Petersen, 2001; Tomita *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009)

A fibrose hepática é um processo de cicatrização de ferida, sendo caracterizada pelo excesso da produção e deposição de componentes da matriz extracelular por células estreladas hepáticas, com predominância do colágeno (Friedman, 1993; Kisseleva e Brenner, 2006). O colágeno constitui um pequeno componente das proteínas totais no fígado. Contudo, na doença, o excesso pode levar à cirrose e consequente ruptura estrutural na arquitetura hepática (Kisseleva e Brenner, 2006). As interações entre hepatócitos repletos de lipídios, células de Kupffer, células inflamatórias e as células estreladas hepáticas são importantes no desenvolvimento subsequente da fibrose e cirrose (Marra *et al.*, 2005). Além disso, a produção de produtos de peroxidação resultantes do acúmulo de gordura excessiva e desenvolvimento do estresse oxidativo podem estimular a produção de colágeno (Albano *et al.*, 2005). No presente trabalho, os animais alimentados, tanto em curto- como longo-prazo com a dieta rica em carboidratos refinados, apresentaram aumento da área contendo colágeno no fígado, sendo que, a maior deposição ocorreu após 8 semanas de dieta HC. Tal fato também encontra-se associado à hiperemia, observada nos mesmos animais, que pode ser decorrente da necessidade de maior irrigação devido à deposição de colágeno, sendo descrita como contribuidora da ocorrência de hipertensão portal e inflamação (Vali *et al.*, 2006; Theodorakis *et al.*, 2009).

Dentre os mediadores inflamatórios que contribuem para a produção de colágeno incluem-se a presença de citocinas pró-fibrogênicas, como TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-13, que por sua vez, são reguladas por outros fatores, tais como noradrenalina e leptina, que agem na proliferação das células estreladas hepáticas (Saxena *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2005). Nos camundongos alimentados com dieta HC, a concentração das citocinas IL-13 e IL-4 aumentaram a partir da 6<sup>a</sup> semana, prevalecendo elevadas nos últimos tempos. Já foi demonstrado que a deficiência de IL-13 protege da cirrose, uma vez que essa citocina atua como mediador primário na formação do colágeno (Kaviratne *et al.*, 2004), assim como, ocorre redução da fibrogênese após inibição de IL-4 (Cheever *et al.*, 1994). O predomínio nos últimos tempos parece indicar também resposta tardia frente à dieta, agindo como potente anti-inflamatório (Marie *et al.*, 1996). Diferente do perfil observado para as citocinas mencionadas acima, as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 apresentaram-se reduzidas ao final do período experimental. Apesar do TNF- $\alpha$  e da IL-6 serem descritas como citocinas que participam da exacerbação da resposta inflamatória, sabe-se que as mesmas, assim como a IL-10, estão relacionadas à regeneração hepática (Yamada *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 1998), sendo que, a presença dessas citocinas pode ser importante na limitação da deposição de colágeno. Antagonicamente, a citocina TNF- $\alpha$  também é descrita como causadora de lesão no fígado (Bradham *et al.*, 1998; Ponnappa *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2009). O período de 3 dias a 6 semanas parece ser caracterizado por essa resposta, refletida no aumento de TNF- $\alpha$ , e ser relacionado ao acúmulo de colesterol no fígado (Mari *et al.*, 2006), além de ter associação com a progressão da fibrose (Bachem *et al.*, 1993; Saile *et al.*, 1999; Simeonova *et al.*, 2001).

A concentração da citocina IL-6 no fígado dos animais alimentados com dieta HC apresentou-se reduzida a partir da 8<sup>a</sup> semana. Já foi demonstrada a ação anti-inflamatória da IL-6, devido à ocorrência de dano hepático em sua ausência (Matthews *et al.*, 2010). Assim, a manutenção da concentração dessa citocina, até a 6<sup>a</sup> semana de dieta, pode ser parte da regulação hepática que visa preservar o fígado do dano tecidual. Da mesma forma, nesse período também foi observado o aumento de IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória clássica, provavelmente na tentativa de suprimir as alterações inflamatórias observadas nesses camundongos (Cintra *et al.*, 2008). Outros fatores, tais como o TGF- $\beta$ , também estão associados com a deposição de colágeno (Czaja *et al.*, 1989; Kanzler *et al.*, 1999; Ueberham *et*

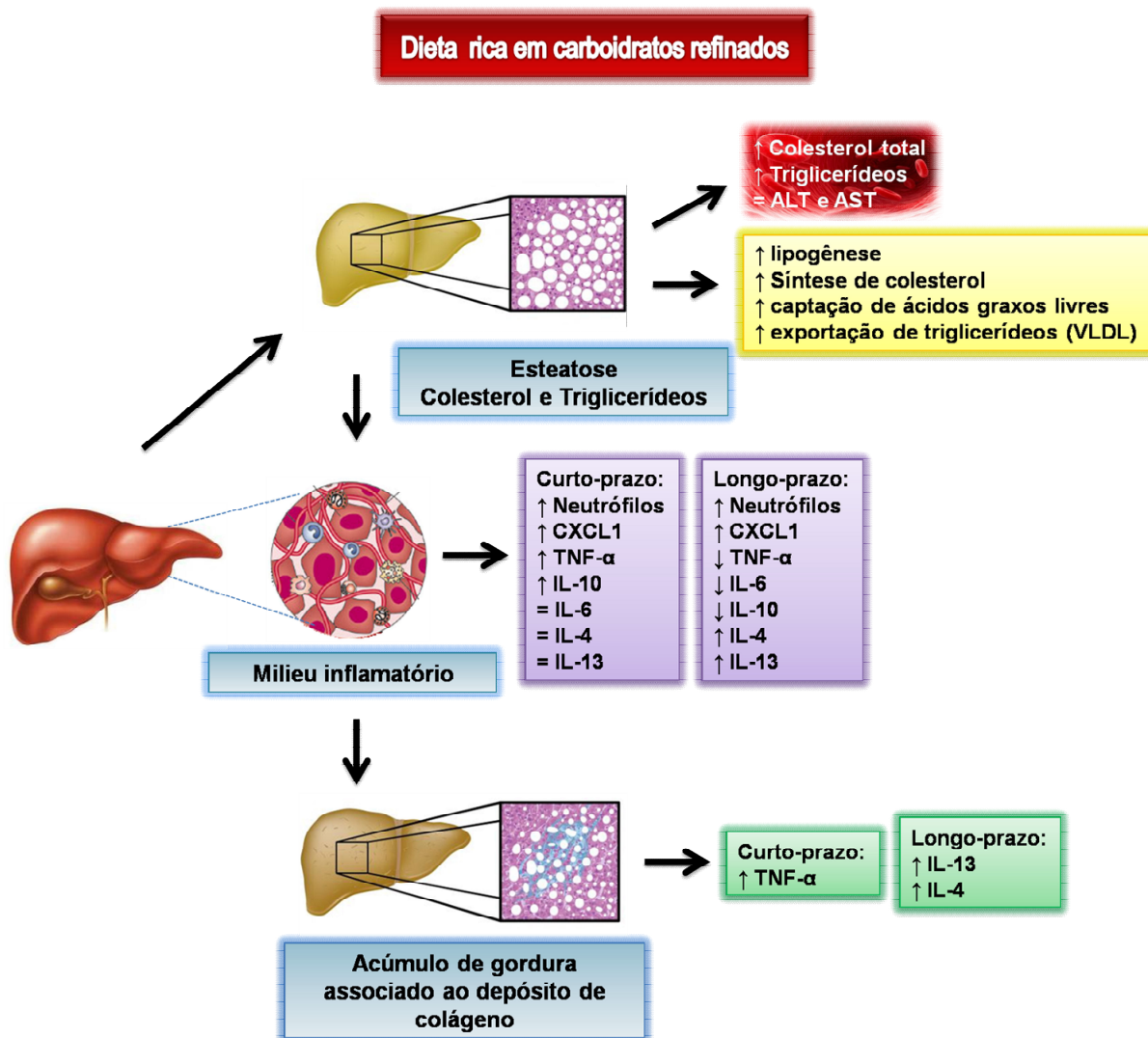
*al.*, 2003) e esse mediador tem sido foco de estudos terapêuticos na tentativa de reverter à fibrose (Gressner e Weiskirchen, 2006; Cheng *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Resultado preliminar do nosso grupo evidenciou que essa citocina também pode estar contribuindo com a deposição de colágeno observada no fígado dos camundongos alimentados com dieta HC (dados não mostrados).

Além dos mediadores anteriormente citados, o desenvolvimento da fibrose hepática também tem sido relacionado à alteração na concentração de adipocitocinas. Camundongos ob/ob, deficientes em leptina, apesar de mais suscetíveis a esteatohepatite, não desenvolvem fibrose no fígado (Leclercq *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2002), sendo o mesmo efeito observado quando ocorre inibição dessa adipocitocina por meio da utilização de antagonista (Elinav *et al.*, 2009). Por outro lado, a adiponectina já foi descrita como importante inibidor da fibrose (Kamada *et al.*, 2003). Dessa forma, diversos fatores estão relacionados à deposição de colágeno pelo consumo de dieta HC, sendo demonstrada a existência de uma integração metabólica e inflamatória responsável pelas alterações observadas.

Apesar de todas as desordens observadas no fígado dos camundongos alimentados com dieta HC, tanto em curto- como longo-prazo, não houve modificação na concentração sistêmica das transaminases ALT e AST. Embora haja estudos que demonstrem alteração nas transaminases em modelos de doença hepática induzida por dieta (Li *et al.*, 2009; Teratani *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013), outros trabalhos não observaram modificação na concentração dessas enzimas (Feldstein *et al.*, 2003; Inoue *et al.*, 2005; Sugatani *et al.*, 2006; Basantani *et al.*, 2011). Sugere-se que a intensidade e o grau do dano hepático possam estar relacionados à presença de tais transaminases no sangue. Assim, é possível que as alterações decorrentes do consumo de dieta HC não sejam suficientes para culminar em aumento das transaminases.

A **Figura 13** representa esquematicamente as alterações hepáticas, em curto- e longo- prazo, presentes nos camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados. Os dados apresentados neste trabalho permitem-nos concluir que o consumo de dieta HC causa esteatose, aumento do recrutamento de

neutrófilos e alteração na concentração de mediadores inflamatórios no fígado, além de induzir maior deposição de colágeno no órgão. Contudo, não altera a concentração sistêmica das transaminases hepáticas.



**Figura 13 – Alterações metabólicas e inflamatórias apresentadas nos camundongos alimentados com dieta rica em carboidratos refinados.** No fígado ocorre acúmulo de lipídios devido ao aumento da lipogênese hepática, síntese de colesterol e captação de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo, que culminarão na maior exportação de VLDL hepático. A esteatose hepática é responsável pelas alterações metabólicas sistêmicas observadas. A presença de lipídios no fígado predispõe a produção de mediadores inflamatórios, como citocinas pró- e anti-inflamatórias, e o aparecimento de neutrófilos; criando um milieu inflamatório decorrente da sobrecarga do nutriente. Por fim, a esteatose, em conjunto com a ativação do sistema imunológico, atua no desenvolvimento da deposição de colágeno hepático; sendo relacionada à produção de citocinas de caráter fibrogênico. Entretanto, apesar das alterações observadas, não ocorreu modificação nas transaminases relacionadas à função hepática. As setas ↑ indicam aumento, ↓ redução e = sem alterações.

## REFERÊNCIAS

ABDULRHMAN, M. et al. The glycemic and peak incremental indices of honey, sucrose and glucose in patients with type 1 diabetes mellitus: effects on C-peptide level-a pilot study. **Acta Diabetol**, v. 48, n. 2, p. 89-94, Jun 2011.

ALBANO, E. et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 987-93, Jul 2005.

AMINE, E. et al. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases : report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation World Health Organization**. Technical Report Series 916: Geneva: World Health Organization, 2002. 149 p.

ARIEL, A. et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. **Nat Immunol**, v. 7, n. 11, p. 1209-16, Nov 2006.

BACHEM, M. G. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 63, n. 2, p. 123-30, 1993.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **J Hepatol**, v. 51, n. 1, p. 212-23, Jul 2009.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 802078, 2010.

BASANTANI, M. K. et al. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. **J Lipid Res**, v. 52, n. 2, p. 318-29, Feb 2011.

BASTARD, J. P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4-12, Mar 2006.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-18, Feb 2005.

BAUTISTA, A. P. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. **Alcohol**, v. 27, n. 1, p. 17-21, May 2002.

BERTRAM, H. C. et al. Impact of high-fat and high-carbohydrate diets on liver metabolism studied in a rat model with a systems biology approach. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 2, p. 676-84, Jan 18 2012.

BILZER, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver Int**, v. 26, n. 10, p. 1175-86, Dec 2006.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 1, p. 3-10, Jan 1997.

BOLLEN, M.; KEPPENS, S.; STALMANS, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. **Biochem J**, v. 336 ( Pt 1), p. 19-31, Nov 15 1998.

BOOGAERTS, J. R. et al. Dietary carbohydrate induces lipogenesis and very-low-density lipoprotein synthesis. **Am J Physiol**, v. 246, n. 1 Pt 1, p. E77-83, Jan 1984.

BRADHAM, C. A. et al. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 1, p. G387-92, Sep 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 152

BRAY, G. A.; POPKIN, B. M. Dietary fat intake does affect obesity! **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 6, p. 1157-73, Dec 1998.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 5 2004.

BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v. 24, n. 1, p. 3-20, Feb 2004.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 9, p. 2467-74, Sep 1999.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 4, p. 798-808, Apr 2007.

BYRNE, A.; REEN, D. J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. **J Immunol**, v. 168, n. 4, p. 1968-77, Feb 15 2002.

CAHOVA, M. et al. The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on Fatty Acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome. **J Nutr Metab**, v. 2012, p. 757205, 2012.

CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 183-90, Feb 2005.

CALDEFIE-CHEZET, F.; POULIN, A.; VASSON, M. P. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. **Free Radic Res**, v. 37, n. 8, p. 809-14, Aug 2003.

CAMERON-SMITH, D. et al. A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 2, p. 313-8, Feb 2003.

CARR, M. C.; BRUNZELL, J. D. Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2601-7, Jun 2004.

CHANDRA, R. K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14304-7, Dec 10 1996.

CHEEVER, A. W. et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **J Immunol**, v. 153, n. 2, p. 753-9, Jul 15 1994.

CHEN, G. C. et al. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 155-64, Feb 2011.



CHENG, K.; YANG, N.; MAHATO, R. I. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis. **Mol Pharm**, v. 6, n. 3, p. 772-9, May-Jun 2009.

CHESS, D. J. et al. A high-fat diet increases adiposity but maintains mitochondrial oxidative enzymes without affecting development of heart failure with pressure overload. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 5, p. H1585-93, Nov 2009.

CHONG, M. F. et al. Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 4, p. 817-23, Apr 2008.

CINTRA, D. E. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **J Hepatol**, v. 48, n. 4, p. 628-37, Apr 2008.

CLARK, J. M.; BRANCATI, F. L.; DIEHL, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1649-57, May 2002.

COHEN, G. et al. Resistin inhibits essential functions of polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 3761-8, Sep 15 2008.

CZAJA, M. J. et al. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. **J Cell Biol**, v. 108, n. 6, p. 2477-82, Jun 1989.

DAS, S. K.; BALAKRISHNAN, V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. **Indian J Clin Biochem**, v. 26, n. 2, p. 202-9, Apr 2011.

DAS, U. N. Is metabolic syndrome X a disorder of the brain with the initiation of low-grade systemic inflammatory events during the perinatal period? **J Nutr Biochem**, v. 18, n. 11, p. 701-13, Nov 2007.

DESPRES, J. P. The insulin resistance-dyslipidemic syndrome of visceral obesity: effect on patients' risk. **Obes Res**, v. 6 Suppl 1, p. 8S-17S, Apr 1998.

DIEHL, A. M. et al. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, v. 54, n. 2, p. 303-6, Feb 2005.

DURRINGTON, P. N. et al. Effects of insulin and glucose on very low density lipoprotein triglyceride secretion by cultured rat hepatocytes. **J Clin Invest**, v. 70, n. 1, p. 63-73, Jul 1982.

EL AKOUM, S. et al. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. **Diabetol Metab Syndr**, v. 3, p. 34, 2011.

ELINAV, E. et al. Competitive inhibition of leptin signaling results in amelioration of liver fibrosis through modulation of stellate cell function. **Hepatology**, v. 49, n. 1, p. 278-86, Jan 2009.

ENGELKING, L. J. et al. Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. **J Clin Invest**, v. 113, n. 8, p. 1168-75, Apr 2004.

ERICKSON, K. L.; MEDINA, E. A.; HUBBARD, N. E. Micronutrients and innate immunity. **J Infect Dis**, v. 182 Suppl 1, p. S5-10, Sep 2000.

FAINBOIM, L. et al. Cytokines and chronic liver disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, n. 1-2, p. 143-57, Feb-Apr 2007.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 5, p. 911-9; quiz 920, May 2005.

FEINGOLD, K. R. et al. The effect of diet on tumor necrosis factor stimulation of hepatic lipogenesis. **Metabolism**, v. 39, n. 6, p. 623-32, Jun 1990.

FELDSTEIN, A. E. et al. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. **J Hepatol**, v. 39, n. 6, p. 978-83, Dec 2003.

FERREIRA, A. V. et al. High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice liver. **Inflammation**, v. 34, n. 2, p. 139-45, Apr 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

FRIEDMAN, S. L. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **N Engl J Med**, v. 328, n. 25, p. 1828-35, Jun 24 1993.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis -- from bench to bedside. **J Hepatol**, v. 38 Suppl 1, p. S38-53, 2003.

GONZALEZ-FLECHA, B.; CUTRIN, J. C.; BOVERIS, A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. **J Clin Invest**, v. 91, n. 2, p. 456-64, Feb 1993.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010.

GOVE, M. E.; FANTUZZI, G. Adipokines, Nutrition, and Obesity. In: BENEDICH, A., DECKELBAUM, R.J. (Ed.). **Preventive Nutrition Nutrition and Health**. 4. ed. New York: Springer, 2010. p.419-432.

GREENBAUM, D. et al. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biol**, v. 4, n. 9, p. 117, 2003.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, Feb 2006.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011.

GRESSNER, A. M.; WEISKIRCHEN, R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 1, p. 76-99, Jan-Mar 2006.

GRESSNER, A. M. et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci**, v. 7, p. d793-807, Apr 1 2002.

GROOT, P. H. et al. Quantitative assessment of aortic atherosclerosis in APOE\*3 Leiden transgenic mice and its relationship to serum cholesterol exposure. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 8, p. 926-33, Aug 1996.

GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 200, n. 2, p. 224-7, Jun 1992.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367-77, May 2008.

HAUBERT, N. J. et al. Experimental induction of steatosis in different tissues after the ingestion of a carbohydrate-rich diet: effect on the liver, on the heart and on indicators of oxidation. **Arq Gastroenterol**, v. 47, n. 4, p. 388-92, Oct-Dec 2010.

HEALEY, C. J.; CHAPMAN, R. W.; FLEMING, K. A. Liver histology in hepatitis C infection: a comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. **Gut**, v. 37, n. 2, p. 274-8, Aug 1995.

HEWETT, J. A. et al. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. **Am J Physiol**, v. 265, n. 6 Pt 1, p. G1011-5, Dec 1993.

HEWETT, J. A. et al. Neutrophil depletion protects against liver injury from bacterial endotoxin. **Lab Invest**, v. 66, n. 3, p. 347-61, Mar 1992.

HORTON, J. D. et al. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 5987-92, May 26 1998.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 67, p. 491-8, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 923-34, Dec 2008.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obes Rev**, v. 11, n. 1, p. 11-8, Jan 2010.

II, H. et al. Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A2-knockout mice. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8089, 2009.

INOUE, M. et al. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 336, n. 1, p. 215-22, Oct 14 2005.

INZAUGARAT, M. E. et al. Altered phenotype and functionality of circulating immune cells characterize adult patients with nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Immunol**, v. 31, n. 6, p. 1120-30, Dec 2011.

IRITANI, N. et al. Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet. **J Nutr**, v. 122, n. 1, p. 28-36, Jan 1992.

JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 7, p. 718-24, Jul 2000.

JAESCHKE, H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 6, p. G1083-8, Jun 2006.

JAESCHKE, H.; FARHOOD, A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 1, p. G355-62, Mar 1991.

JAESCHKE, H.; FARHOOD, A.; SMITH, C. W. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. **Am J Physiol**, v. 261, n. 6 Pt 1, p. G1051-6, Dec 1991.

JAESCHKE, H.; HASEGAWA, T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. **Liver Int**, v. 26, n. 8, p. 912-9, Oct 2006.

JAESCHKE, H.; SMITH, C. W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. **J Leukoc Biol**, v. 61, n. 6, p. 647-53, Jun 1997.

JANEVSKI, M. et al. Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. **Food Funct**, v. 3, n. 2, p. 141-9, Feb 2012.

KAMADA, Y. et al. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1796-807, Dec 2003.

KANG, S.; DAVIS, R. A. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1529, n. 1-3, p. 223-30, Dec 15 2000.

KANZLER, S. et al. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4 Pt 1, p. G1059-68, Apr 1999.

KARMEN, A.; WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Transaminase activity in human blood. **J Clin Invest**, v. 34, n. 1, p. 126-31, Jan 1955.

KAVIRATNE, M. et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. **J Immunol**, v. 173, n. 6, p. 4020-9, Sep 15 2004.

KELLEY, D. E. et al. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. **J Clin Invest**, v. 92, n. 1, p. 91-8, Jul 1993.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO Rep**, v. 2, n. 4, p. 282-6, Apr 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. Glândulas digestórias. In: KIERSZENBAUM, A. L. (Ed.). **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.489-518.

KIM, T. H. et al. An active metabolite of oltipraz (M2) increases mitochondrial fuel oxidation and inhibits lipogenesis in the liver by dually activating AMPK. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 7, p. 1647-61, Apr 2013.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21 Suppl 3, p. S84-7, Oct 2006.

KOLETZKO, B. et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. **Br J Nutr**, v. 80 Suppl 1, p. S5-45, Aug 1998.

KRONENBERG, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 877-900, 2005.

KWITEROVICH, P. O., JR. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am J Cardiol**, v. 86, n. 12A, p. 5L-10L, Dec 21 2000.

LANTHIER, N. et al. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 1, p. G107-16, Jan 2010.

LE, M. T. et al. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. **Metabolism**, v. 61, n. 5, p. 641-51, May 2012.

LECLERCQ, I. A. et al. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. **J Hepatol**, v. 37, n. 2, p. 206-13, Aug 2002.

LEE, S. H. Ultrastructural localization of glutamic oxalacetic transaminase activity in cardiac muscle fiber and cardiac mitochondrial fraction of the rat. **Histochemie**, v. 19, n. 2, p. 99-109, 1969.

LEE, Y. S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-83, Oct 2011.

LEFKOWITCH, J. H.; HAYTHE, J. H.; REGENT, N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. **Mod Pathol**, v. 15, n. 7, p. 699-704, Jul 2002.

LI, H. et al. ATF4 deficiency protects mice from high-carbohydrate-diet-induced liver steatosis. **Biochem J**, v. 438, n. 2, p. 283-9, Sep 1 2011.

LISBONNE, M. et al. Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 6, p. 1720-32, Jun 2011.

LIU, Q.; BENGMARK, S.; QU, S. The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 42, 2010.

LIU, Y. et al. Inhibition of PDGF, TGF-beta, and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. **J Hepatol**, v. 55, n. 3, p. 612-25, Sep 2011.

LLAGOSTERA, E. et al. High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase. **FEBS Lett**, v. 583, n. 12, p. 2121-5, Jun 18 2009.

LOUIS, H. et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. **Hepatology**, v. 28, n. 6, p. 1607-15, Dec 1998.

LUCKEY, S. W.; PETERSEN, D. R. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. **Exp Mol Pathol**, v. 71, n. 3, p. 226-40, Dec 2001.

LUMENG, C. N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, Jan 2007.

MAGALANG, U. J. et al. Adiponectin inhibits superoxide generation by human neutrophils. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 11-12, p. 2179-86, Nov-Dec 2006.

MANSUY-AUBERT, V. et al. Imbalance between Neutrophil Elastase and its Inhibitor alpha1-Antitrypsin in Obesity Alters Insulin Sensitivity, Inflammation, and Energy Expenditure. **Cell Metab**, v. 17, n. 4, p. 534-48, Apr 2 2013.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Aug 2011.

MARCEAU, P. et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 5, p. 1513-7, May 1999.

MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1844-50, Aug 2001.

MARCHESINI, G. et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **Am J Med**, v. 107, n. 5, p. 450-5, Nov 1999.

MARCHESINI, G.; FORLANI, G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 497-9, Feb 2002.

MARI, M. et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. **Cell Metab**, v. 4, n. 3, p. 185-98, Sep 2006.

MARIE, C. et al. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGFbeta) of interleukin-8 production by LPS- and/ or TNFalpha-activated human polymorphonuclear cells. **Mediators Inflamm**, v. 5, n. 5, p. 334-40, 1996.

MARQUES, P. E. et al. Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1971-82, Nov 2012.

MARRA, F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Front Biosci**, v. 7, p. d1899-914, Sep 1 2002.

MARRA, F. et al. Review article: the pathogenesis of fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 22 Suppl 2, p. 44-7, Nov 2005.

MATA, P. et al. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 11, p. 1347-55, Nov 1996.

MATTES, R. D.; POPKIN, B. M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 1, p. 1-14, Jan 2009.

MATTHEWS, V. B. et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. **Diabetologia**, v. 53, n. 11, p. 2431-41, Nov 2010.



MENDEZ-SANCHEZ, N. et al. Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver Int**, v. 27, n. 4, p. 423-33, May 2007.

MILAGRO, F. I.; CAMPION, J.; MARTINEZ, J. A. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 7, p. 1118-23, Jul 2006.

MITTENDORFER, B.; SIDOSSIS, L. S. Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 5, p. 892-9, May 2001.

MIYAZAKI, M. et al. Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. **Cell Metab**, v. 6, n. 6, p. 484-96, Dec 2007.

MOKDAD, A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **JAMA**, v. 289, n. 1, p. 76-9, Jan 1 2003.

MONTECUCCO, F. et al. Induction of neutrophil chemotaxis by leptin: crucial role for p38 and Src kinases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1069, p. 463-71, Jun 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Worth Publishers, 2004. 1100 p.

NELSON, G. J. The lipid composition of normal mouse liver. **J Lipid Research**, v. 3, n. 1, p. 256-62, Apr 1962.

NG, S. F. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 963-6, Oct 21 2010.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGAI, R. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. **Discov Med**, v. 8, n. 41, p. 55-60, Aug 2009.

OBSTFELD, A. E. et al. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) regulates the hepatic recruitment of myeloid cells that promote obesity-induced hepatic steatosis. **Diabetes**, v. 59, n. 4, p. 916-25, Apr 2010.

ODEGAARD, J. I. et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. **Cell Metab**, v. 7, n. 6, p. 496-507, Jun 2008.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, Dec 12 2012.

PAGANO, G. et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 367-72, Feb 2002.

PARK, E. J. et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197-208, Jan 22 2010.

PARKS, E. J. et al. Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance. **J Clin Invest**, v. 104, n. 8, p. 1087-96, Oct 1999.

PETERS, M. et al. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1663-71, Dec 2000.

PONNAPPA, B. C. et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 4, p. 569-77, Feb 15 2005.

POPKIN, B. M. Global changes in diet and activity patterns as drivers of the nutrition transition. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program**, v. 63, p. 1-10; discussion 10-4, 259-68, 2009.

POPKIN, B. M.; NIELSEN, S. J. The sweetening of the world's diet. **Obes Res**, v. 11, n. 11, p. 1325-32, Nov 2003.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 3, p. 829-38, Mar 2008.

RABE, K. et al. Adipokines and insulin resistance. **Mol Med**, v. 14, n. 11-12, p. 741-51, Nov-Dec 2008.

REAVEN, G. M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. **Annu Rev Nutr**, v. 25, p. 391-406, 2005.

ROBERTS, R. et al. Reduced oxidation of dietary fat after a short term high-carbohydrate diet. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 4, p. 824-31, Apr 2008.

RUSSO, R. C. et al. Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 410-21, Apr 2009.

SAILE, B. et al. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 196-202, Jul 1999.

SAITO, J. M. et al. Infiltrating neutrophils in bile duct-ligated livers do not promote hepatic fibrosis. **Hepatol Res**, v. 25, n. 2, p. 180-191, Feb 2003.

SALLIS, J. F.; GLANZ, K. Physical activity and food environments: solutions to the obesity epidemic. **Milbank Q**, v. 87, n. 1, p. 123-54, Mar 2009.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 13 2001.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-17, Jun 2011.

SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiol Rev**, v. 87, n. 2, p. 507-20, Apr 2007.

SAXENA, N. K. et al. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 762-71, Apr 2002.

SCHWABE, R. F.; BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 5, p. G949-58, Nov 2003.

SCHWARZ, J. M. et al. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 1, p. 43-50, Jan 2003.

SHEK, F. W.; BENYON, R. C. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 2, p. 123-6, Feb 2004.

SHEPARD, T. Y. et al. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 4, p. 703-8, Apr 2001.

SHI, Z.; WAKIL, A. E.; ROCKEY, D. C. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 20, p. 10663-8, Sep 30 1997.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-80, May 2007.

SIMEONOVA, P. P. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 177, n. 2, p. 112-20, Dec 1 2001.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 427-39, Jun 2010.

SORENSEN, O. E. et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. **Blood**, v. 97, n. 12, p. 3951-9, Jun 15 2001.

SRINIVASAN, S. R. et al. Varied effects of dietary sucrose and cholesterol on serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in rhesus monkeys. **Atherosclerosis**, v. 33, n. 3, p. 301-14, Jul 1979.

STANHOPE, K. L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J Clin Invest**, v. 119, n. 5, p. 1322-34, May 2009.

STANTON, M. C. et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. **J Inflamm (Lond)**, v. 8, p. 8, 2011.

STEFANOVIC, L.; BRENNER, D. A.; STEFANOVIC, B. Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 230, n. 8, p. 573-86, Sep 2005.

SUGATANI, J. et al. Dietary inulin alleviates hepatic steatosis and xenobiotics-induced liver injury in rats fed a high-fat and high-sucrose diet: association with the suppression of hepatic cytochrome P450 and hepatocyte nuclear factor 4alpha expression. **Drug Metab Dispos**, v. 34, n. 10, p. 1677-87, Oct 2006.

SUNDARAM, M.; YAO, Z. Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. **Nutr Metab (Lond)**, v. 7, p. 35, 2010.

SYN, W. K. et al. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 6, p. 1998-2007, Jun 2010.

TAGHIBIGLOU, C. et al. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. **J Biol Chem**, v. 275, n. 12, p. 8416-25, Mar 24 2000.

TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1407-12, Sep 2012.

TANDRA, S. et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 55, n. 3, p. 654-9, Sep 2011.

TANNAPFEL, A. et al. Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. **Virchows Arch**, v. 458, n. 5, p. 511-23, May 2011.

TAZAWA, Y. et al. Effect of weight changes on serum transaminase activities in obese children. **Acta Paediatr Jpn**, v. 39, n. 2, p. 210-4, Apr 1997.

TERATANI, T. et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 152-164 e10, Jan 2012.

THEODORAKIS, N. G. et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in the development of portal hypertension in the carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, n. 4, p. G792-9, Oct 2009.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. **Trends Endocrinol Metab**, v. 19, n. 10, p. 371-9, Dec 2008.

TOMITA, K. et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. **Gut**, v. 55, n. 3, p. 415-24, Mar 2006.

TRELLAKIS, S. et al. Low adiponectin, high levels of apoptosis and increased peripheral blood neutrophil activity in healthy obese subjects. **Obes Facts**, v. 5, n. 3, p. 305-18, 2012.

TSUDA, Y. et al. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 215-26, Aug 2004.

TSUKAMOTO, H. et al. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 10 Suppl 1, p. S50-3, 1995.

UEBERHAM, E. et al. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1067-78, May 2003.

UEHARA, M.; SATO, N. Impaired ability of neutrophils to produce oxygen-derived free radicals in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 20, n. 2, p. 326-30, Aug 1994.

UYEDA, K.; REPA, J. J. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. **Cell Metab**, v. 4, n. 2, p. 107-10, Aug 2006.

VALI, L. et al. Reduced antioxidant level and increased oxidative damage in intact liver lobes during ischaemia-reperfusion. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 7, p. 1086-91, Feb 21 2006.

VANSAUN, M. N. et al. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. **Am J Pathol**, v. 175, n. 1, p. 355-64, Jul 2009.

VARANI, J.; WARD, P. A. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. **Shock**, v. 2, n. 5, p. 311-9, Nov 1994.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 1, p. 13-27, Jan 2001.

W.H.O. Obesity and overweight. 2012. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> >. Acesso em: 13 dez. 2012.

WANG, J. et al. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 713-23, Aug 2009.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 115-24, Jan 2006.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1785-8, Dec 2003.

WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J. Rebuilding the food pyramid. **Scientific American**, v. 288, n. 1, 2003.

WILLIAMS, M. R. et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol**, v. 32, n. 10, p. 461-9, Oct 2011.

WISSE, E. et al. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. **Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 683-92, Jul-Aug 1985.

WONG, J. et al. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. **J Clin Invest**, v. 99, n. 11, p. 2782-90, Jun 1 1997.

WULLAERT, A. et al. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. **Endocr Rev**, v. 28, n. 4, p. 365-86, Jun 2007.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821-30, Dec 2003.

YAMADA, Y. et al. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 4, p. 1441-6, Feb 18 1997.

YAMAGUCHI, 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, Jun 2007.

YAMASHITA, H. et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9116-21, Jul 31 2001.

YANG, S. Q. et al. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 6, p. 2557-62, Mar 18 1997.

ZEYDA, M. et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. **Int J Obes (Lond)**, v. 31, n. 9, p. 1420-8, Sep 2007.

ZHANG, S. H. et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 468-71, Oct 16 1992.

ZOU, W. et al. Sulindac metabolism and synergy with tumor necrosis factor-alpha in a drug-inflammation interaction model of idiosyncratic liver injury. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 331, n. 1, p. 114-21, Oct 2009.



# **ANEXO A**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 60/2010**, relativo ao projeto intitulado "*Relação temporal entre a ocorrência da obesidade, intolerância à glicose, resposta inflamatória e alterações metabólicas em camundongos alimentados com dieta palatável*", que tem como responsável(is) **Adaliene Versiani Matos Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 06/2010**.

Este certificado expira-se em **9/ 06/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 60/2010**, related to the project entitled "*Temporal relationship between the occurrence of obesity, glucose intolerance, inflammatory response and metabolic changes in mice fed a palatable diet*", under the supervisors of **Adaliene Versiani Matos Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **June 9, 2010**.

This certificate expires in **June 9, 2015**.

Beio Horizonte, 15 de Junho de 2010.

Prof<sup>a</sup>. **Jacqueline Inaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-1516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)