

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

MARIA LUIZA RODRIGUES PEREIRA LIMA

**MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM RATOS, POR DIETA
ENRIQUECIDA COM SACAROSE: ênfase na patogenia da doença hepática
gordurosa não alcoólica**

Belo Horizonte

2013

MARIA LUIZA RODRIGUES PEREIRA LIMA

**MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM RATOS, POR DIETA
ENRIQUECIDA COM SACAROSE: ênfase na patogenia da doença hepática
gordurosa não alcoólica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Virgínia Hora Rios Leite.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2013

L732m Lima, Maria Luiza Rodrigues Pereira.
Modelo experimental de obesidade em ratos, por dieta enriquecida com sacarose [manuscrito]: ênfase na patogenia da doença hepática gordurosa não alcoólica. / Maria Luiza Rodrigues Pereira. -- Belo Horizonte: 2013.
87f.: il.
Orientador: Teresa Cristina de Abreu Ferrari.
Co-Orientador: Virginia Hora Rios Leite.
Área de concentração: Ciências Aplicadas ao Aparelho Digestivo.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Modelos Animais. 2. Síndrome x Metabólica. 3. Antioxidantes. 4. Estresse Oxidativo. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Ferrari, Teresa Cristina de Abreu. II. Leite, Virginia Hora Rios. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WD 210

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Prof. Ricardo de Menezes Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Prof. Paulo Caramelli

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto

Prof^a. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Prof^a. Valéria Maria Azeredo Passos

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Prof. Paulo Caramelli

Representantes discentes

Andréa de Lima Bastos (representante discente, titular)

Luiza Campos Caldeira Brant (representante discente, suplente)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM RATOS, POR DIETA ENRIQUECIDA COM SACAROSE: ÊNFASE NA PATOGENIA DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

MARIA LUIZA RODRIGUES PEREIRA LIMA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS AO APARELHO DIGESTIVO.

Aprovada em 13 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Orientadora
UFMG

Eduardo Garcia Vilela

Prof. Eduardo Garcia Vilela
UFMG

Paula Vieira Veixeira Vidigal

Prof. Paula Vieira Veixeira Vidigal
UFMG

Adriana Aparecida Bosco

Prof. Adriana Aparecida Bosco
IEP-SCBH

Josefina Bressan

Prof. Josefina Bressan
UFV

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2013.

Ao Magno, meu marido;
aos meus queridos filhos,
Marcos Túlio e Guilherme Augusto,
pela compreensão das longas ausências;
e, especialmente, ao meu filho, Antonio Carlos,
pela inestimável colaboração
durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari, por ter me acolhido no Programa Saúde do Adulto e pela sua competente orientação.

À Professora Virginia Hora Rios Leite, por esses 11 anos de convivência e aprendizado, por todo seu encorajamento, pela sua amizade e, principalmente, pela participação efetiva na minha formação profissional e pessoal; você é uma pessoa muito especial para mim.

Ao Professor Dr. Cândido Coimbra, pela cooperação intelectual e material na execução deste trabalho.

À Professora Laura Hora Rios Leite, carinhosamente “Laurinha”, pela sua ajuda inestimável em todas as etapas deste estudo.

À querida “Gracielle”, pela sua generosa cooperação.

A Carolina Rosa Gioda, por toda sua generosidade, pela sua cooperação na execução deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios de Bioquímica e Farmácia, Fisiologia, Patologia Veterinária e da Patologia Médica da UFMG, pela cooperação neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento desta pesquisa.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer.

RESUMO

Introdução: na atualidade a obesidade tem se tornado epidemia, que pode ser atribuída, em parte, ao consumo exagerado de gordura saturada e açúcares simples e à redução da atividade física. Uma das suas consequências é a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), cuja prevalência em obesos com diabetes *mellitus* tipo 2 é de aproximadamente 70%. Muitos aspectos da NAFLD ainda não são conhecidos. O objetivo deste estudo foi desenvolver modelo experimental de NAFLD para avaliação de alterações patogenéticas e fisiopatológicas relacionadas a essa entidade. **Método:** 30 ratos *Wistar* foram alimentados com dieta com adição de sacarose (grupo experimental – GE) e 30 receberam dieta padrão (grupo-controle – GC). Seis ratos de cada grupo foram sacrificados na 5^a, 10^a, 20^a e 30^a semanas. Na ocasião do sacrifício, foram avaliados os parâmetros antropométricos, bioquímicos, metabólicos, hormonais, marcadores de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e histologia hepática. Após obesidade estabelecida, 12 animais de cada grupo (GEex e GCex) foram submetidos a treinamento físico por cinco semanas, seguindo-se avaliação dos diversos parâmetros. **Resultados:** os níveis de glicose, colesterol-VLDL e triglicérides foram mais altos no GE na 30^a semana e os níveis de insulina e leptina foram superiores no GE em todos os tempos. Observou-se correlação positiva entre aumento do índice de massa corporal (IMC) e valores séricos de leptina. As enzimas antioxidantes – superóxido dismutase e catalase – foram inferiores no GE na 30^a semana. Esteatose e balonização hepatocelular foram verificadas apenas no GE, assim como a expressão de malondialdeído. Expressão hepática do receptor Ob-R da leptina foi positiva em ambos os grupos, enquanto a expressão de leptina foi mais intensa no GE. Os níveis de colesterol-HDL foram mais elevados e a peroxidação lipídica hepática inferior nos ratos que praticaram exercícios físicos. **Conclusão:** dieta enriquecida em carboidratos simples foi capaz de induzir obesidade com potencial desenvolvimento de NAFLD. O treinamento físico reduziu os níveis de peroxidação lipídica hepática.

Palavras-chave: Dieta. Modelo Experimental. Síndrome Metabólica. Enzimas Antioxidantes. Estresse Oxidativo. NAFLD.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is currently an epidemic disease caused in part by dietary consumption of saturated fats and simple sugars and a sedentary lifestyle; it can lead to non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) whose prevalence in obese patients with diabetes mellitus type 2 is of approximately 70%. Many aspects of NAFLD are as yet unknown. The aim of the study was to develop an experimental model of NAFLD to analyse pathogenic and pathophysiological changes related to this entity. **Method:** Thirty wistar rats were fed an added dietary sucrose (experimental group - GE); 30 received standard diet (control group - GC). Six rats from each group were sacrificed on the 5th, 10th, 20th and 30th weeks. At that occasion, anthropometric, biochemical, metabolic and hormonal parameters as well as oxidative stress markers, antioxidant enzymes and liver histology were evaluated. After obesity was established, 12 animals from each group (GEex and GCex) were submitted to physical training for five weeks and the various parameters were evaluated. **Results:** Glucose, VLDL-cholesterol and triglycerides levels were higher in the GE at 30 weeks; insulin and leptin levels were constantly higher in the GE. There was a positive correlation between an increase in BMI and serum leptin levels. The antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase were lower in the GE at 30 weeks. Steatosis and hepatocellular ballooning as well as malondialdehyde levels were observed only in the GE. Hepatic expression of the Ob-R receptor of leptin was positive in both groups, while leptin expression was more intense in the EG. HDL cholesterol levels were higher and hepatic lipid peroxidation lower in rats submitted to physical exercises. **Conclusion:** Diet rich in simple carbohydrates induced obesity that contributes to the development of NAFLD. Physical training reduced levels of hepatic lipid peroxidation.

Key Words: Diet. Experimental Model. Metabolic Syndrome. Antioxidant Enzymes. Oxidative Stress. NAFLD.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina-aminotransferase
AST	Aspartato-aminotrasferase
ATP	Adenosina trifosfato
CA	Circunferência abdominal
CT	Circunferência torácica
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Ácido dietilenotriamino-pentacético
ENDEF	Estudo Nacional sobre Despesa Familiar
FADH2	Dinucleótido de flavina e adenina
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FDA	<i>Food and Droug Administration</i>
GC	Grupo-controle
GE	Grupo experimental
GGT	Gama-glutamil-transpeptidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HNE	4-hidroxinonenal
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
MCD	Deficiência de colina e metionina
MDA	Malondialdeído
NAFLD	<i>Nonalcoholic fatty liver disease</i>
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>

NCEP-ATP III	<i>Third Report of National Cholesterol Education Programam Expert Panel on Detection, Evolution, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults - Adult Treatment Panel III</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PNSN	Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição
PPV	Pesquisa sobre Padrões de Vida
RM	Ressonância magnética
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	Dodecyl sulfato de sódio
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TC	Tomografia computadorizada
TIBARS	Ácido tibarbitúrico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
US	Ultrassonografia
VLDL	<i>Very low density liprotein</i>

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Antecedentes científicos.....	14
1.1.1 Aspectos gerais sobre obesidade.....	15
1.1.2 Obesidade e NAFLD.....	17
1.1.3 Aspectos gerais do diagnóstico da NAFLD/NASH.....	21
1.1.4 Aspectos gerais do tratamento da NAFLD.....	23
1.1.5 Modelos experimentais de dieta induzindo a obesidade associada à NAFLD.....	28
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais e desenho experimental.....	34
3.2 Dieta.....	34
3.3 Aferições das medidas antropométricas.....	35
3.4 Treinamento físico.....	35
3.5 Sacrifício dos animais, coleta e preparo do material biológico.....	36
3.6 Dosagens bioquímicas e de hormônios no sangue.....	36
3.7 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes.....	37
3.8 Dosagem do ácido tiobarbitúrico (TIBARS).....	37
3.9 Avaliação histológica.....	38
3.10 Expressão hepática de malondialdeído, obr-leptina e leptina.....	38
3.11 Análise estatística.....	39
REFERÊNCIAS	40

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

4 RESULTADOS E ANÁLISE DOS DADOS.....	50
4.1 Artigo 1 - <i>Sucrose-rich diet induced obesity model: emphasis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.....</i>	50
4.2 Artigo 2 - Efeitos do treinamento aeróbico sobre a peroxidação lipídica hepática em ratos <i>Wistar</i> em modelo experimental de obesidade associada à NAFLD.....	85
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
ANEXO.....	87

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, a obesidade tem se tornado uma epidemia que pode ser atribuída, em parte, ao consumo exagerado de gordura saturada e açúcares simples, como sacarose e frutose (BRAY; NIELSEN; POPLIN, 2004; ELLIOT *et al.*, 2002; KOPELMAN, 2000), e à redução da atividade física devido ao estilo de vida moderno (RAVUSSIN, 2005). A obesidade não é simplesmente um problema estético, mas fator de risco para muitas doenças.

O fígado também é acometido por esse estado de opulência. A obesidade, em particular, está francamente associada à doença hepática gordurosa não alcoólica, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD) (ANGULO; LINDOR, 2002; LIMA *et al.*, 2005; WANLESS; LENTZ, 1990) e é fator preditivo para o avanço da doença (DIXON; BHATHAL; O'BRIEN, 2001). A NAFLD é de gravidade crescente, caracterizada por esteatose, esteato-hepatite (necroinflamação) e fibrose-cirrose. Estima-se que 70% das pessoas obesas e com diabetes tipo II tenham esteatose, embora essa prevalência seja de 15 a 25% na população geral (ANGULO; LINDOR, 2002; CORNIER *et al.*, 2008; NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). A doença não escolhe faixa etária, acometendo também as crianças (ANGULO; LINDOR, 2002; SCHWIMMER *et al.*, 2007). Existe, portanto, uma epidemia de obesidade e a NAFLD é um grande desafio para a próxima década (BEGRICHE *et al.*, 2006).

Faltam estudos prospectivos sobre a história natural da NAFLD associada à obesidade. Entretanto, estudos retrospectivos documentaram que a esteatose isolada pode permanecer estável ou evoluir para esteato-hepatite não alcoólica, do inglês *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH), e progredir para fibrose ou cirrose (ANGULO; LINDOR, 2002; FASSIO *et al.*, 2004; MATTEONI *et al.*, 1999).

Considerando-se a etiopatogenia da doença, recomenda-se reduzir os fatores de risco, na expectativa de se prevenir a evolução da mesma (ANGULO; LINDOR, 2002; SANYAL *et al.*, 2001). Sendo assim, as recomendações para o tratamento da NAFLD estão fundamentadas na modificação do estilo de vida, associada à terapia farmacológica (CHALASANI *et al.*, 2012).

A dieta ou combinação de dieta e exercícios físicos têm sido indicadas para o tratamento da obesidade e da NAFLD. Porém, as publicações que avaliaram o

impacto da dieta na NAFLD não são conclusivas e não existem estudos controlados em humanos (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). Assim, os estudos experimentais têm evidenciado associação entre determinadas características da dieta e a ocorrência de NAFLD/NASH, como observado, por exemplo, em relação às dietas deficientes de colina e metionina (ANSTEE; GOLDIN, 2006), aquelas com alto teor de gordura (LIEBER *et al.*, 2004) e as enriquecidas com frutose (ACKERMAN *et al.*, 2005; ARMUTCU *et al.*, 2005; KAWASAKI *et al.*, 2009; SPRUSS *et al.*, 2009). Entretanto, em nenhum desses modelos foi possível reproduzir completamente a histopatologia, patogenia e fisiopatologia da NAFLD/NASH descrita para seres humanos. No modelo de dieta enriquecida com frutose, descrito por Kawasaki *et al.* (2009), não foi possível nem mesmo alcançar a obesidade. E nos demais não há qualquer descrição da evolução cronológica da doença a partir da indução da obesidade (TAKAHASCHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012), tampouco dos efeitos da composição dietética no curso natural da NAFLD (FINELLI; TARANTINO, 2012).

Portanto, modelos experimentais, por permitirem controle da heterogeneidade genética e fatores ambientais, podem favorecer a compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da NAFLD e na sua melhora associada a mudanças do estilo de vida, abrindo novas possibilidades de pesquisas em humanos. Neste estudo foram investigados os efeitos da dieta enriquecida em carboidratos simples na indução de obesidade em ratos *Wistar*, com o objetivo de contribuir para o conhecimento dos fatores nutricionais que participam da gênese da NAFLD associada à obesidade. Adicionalmente, avaliou-se, em um grupo de ratos após obesidade estabelecida, o impacto do treinamento físico aeróbico sobre as variáveis investigadas, especialmente, sobre a peroxidação lipídica hepática.

1.1 Antecedentes científicos

Nos próximos subitens serão abordados os diversos aspectos históricos sobre a obesidade associada à NAFLD.

1.1.1 Aspectos gerais sobre obesidade

A obesidade é, na atualidade, um problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. As causas atribuídas ao incremento da prevalência de obesidade foram enfocadas no trabalho de revisão de Shuldiner e Munir (2003). Os autores relatam que a explosão atual da prevalência dessa enfermidade não pode ser somente devida a fatores genéticos, pois estes não foram alterados durante os últimos tempos. Portanto, fatores ambientais parecem ser os indutores de um comportamento que leva à obesidade, destacando-se o consumo exagerado de gordura saturada e açúcares simples como a sacarose e a frutose (BRAY; NIELSEN; POLPLIN, 2004; KOPELMAN, 2000), ao lado da redução da atividade física, típica do estilo de vida moderno (RAVUSSIN, 2005).

Obesidade é caracterizada por excesso das reservas de gordura corporal. A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs classificação gradual do peso corporal por meio do índice de massa corpórea (IMC). O termo obesidade é usado quando o IMC é igual ou superior a 30 kg/m² (SEEDO, 2000). A aplicação de tal classificação em estudos permitiu identificar a gordura corporal como fator de morbidade e mortalidade (LIU *et al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que quanto mais alto o IMC, mais elevada é a incidência de diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemias, doenças cardiovasculares, NAFLD, complicações ortopédicas, alterações respiratórias (apneia do sono) e hormonais (resistência à insulina com hiperinsulinemia, redução dos níveis de hormônio do crescimento e de testosterona, alterações metabólicas resultantes do hipotireoidismo e, ainda, aumento do risco de complicações em cirurgia e trauma (BRAY, 1985) (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003) A taxa de mortalidade entre pacientes obesos aumenta seis a 12 vezes, conforme o grau de obesidade (VAN ITALLIE; YANG, 1984).

A topografia da obesidade permite predizer o risco de doenças. A obesidade central associa-se de modo independente aos componentes da síndrome metabólica (SM) e à resistência à insulina (KATSUKI *et al.*, 2003; RATTARASARN *et al.*, 2003) e ao risco de doenças cardiovasculares, particularmente de doença coronariana (JANSSEN; KATZMARZYK; ROSS,

2002). Quando comparada ao IMC, a circunferência abdominal (CA) tem se mostrado superior na identificação de gordura visceral.

Nesse contexto, o *Third Report of National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults - Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) propôs a CA como um dos parâmetros que compõem os critérios para diagnóstico de SM (MUSSO *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos têm revelado prevalência crescente de obesidade. Os resultados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), de 2003-2004, com base no IMC, indicam que 66,3% dos adultos nos Estados Unidos têm sobrepeso ou são obesos (OGDEN *et al.*, 2006).

No Brasil, segundo dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, 48% dos homens e 35,5% das mulheres são obesos. Monteiro *et al.* (2000), objetivando descrever a tendência à obesidade nos vários segmentos dos grupos socioeconômicos da população brasileira adulta e utilizando os dados contidos em três pesquisas nacionais – Estudo Nacional sobre Despesa Familiar (ENDEF), 1975 (n=89.722); Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN), 1989 (n=14.602); e Pesquisa sobre Padrões de Vida (PPV), 1997 (n=11.033) –, identificaram aumento da prevalência de obesidade no período 1975-1989 em todos os grupos sociais, à exceção de homens que residiam na zona rural, pois estes não foram incluídos na amostra. No período de 1989-1997, o padrão de distribuição da obesidade apresentou mudança, registrando-se maior prevalência em homens em relação às mulheres, tanto na zona urbana quanto rural, pontuando mais as famílias pobres que as ricas. Os autores sugerem que o leve declínio da obesidade entre mulheres urbanas possa ser devido ao trabalho da mídia em divulgar os malefícios do estilo de vida sedentário e hábitos alimentares errôneos.

O aumento da prevalência da obesidade acompanha o da prevalência da SM. Com base nos critérios estabelecidos pelo ATP III e utilizando os dados do NHANES 1999-2000, verificou-se que 26,7% dos adultos americanos têm SM, o que corresponde a aumento de 3,6%, quando se compara com os dados do NHANES III (1988-1994) (FORD *et al.*, 2008).

E importante salientar que o incremento da prevalência da obesidade e da SM nos Estados Unidos ocorre paralelamente ao elevado consumo *per capita* de alimentos ricos em frutose, como, por exemplo, o xarope de milho (sacarose-frutose). Nos anos de 1970, verificou-se baixo consumo de alimentos ricos em frutose; entretanto, nos anos 1980 a 2000, a ingestão desses alimentos correspondeu a 91,6 g por pessoa/dia, representando 42% das calorias totais ingeridas (BRAY; NIELSEN; POLPLIN, 2004).

1.1.2 Obesidade e NAFLD

A associação entre obesidade e esteatose hepática foi inicialmente descrita na década de 50 por Westwater e Fainer (1958). No entanto, nenhum progresso foi observado até que Adler e Schaffner (1979), considerando as controvérsias sobre a existência de lesão hepática grave na obesidade, estudaram biópsias hepáticas de 29 pacientes obesos, com 150 a 300% de sobrepeso, selecionados por apresentarem hepatomegalia e/ou anormalidades dos exames bioquímicos que avaliam lesão e/ou função hepática. A amostra incluía diabéticos (tipo II) e pacientes em uso de anti-hipertensivos e diuréticos, sendo excluídos aqueles com história de consumo excessivo de álcool ou com outra doença hepática crônica. Histologicamente, em grau crescente de gravidade, foram encontrados quatro grupos de lesão (esteatose, hepatite, fibrose e cirrose), sem associação entre gravidade da lesão hepática e grau de esteatose. A atividade das aminotransferases hepáticas foi normal em muitos pacientes dos quatro grupos considerados e a prevalência de diabetes foi igual em todos eles. Os autores referiram que as alterações usualmente encontradas na hepatite alcoólica podiam também ser vistas em pacientes com sobrepeso e durante o primeiro ano após *bypass* jejunoileal, levando-os a concluir que a obesidade pode produzir lesão hepática grave, incluindo-se cirrose.

O termo NASH foi primeiramente empregado por Ludwig *et al.* (1980) para designar uma nova doença que se apresentava com lesões semelhantes às da hepatite alcoólica na ausência de alcoolismo. Em estudo retrospectivo (pelo período de 10 anos), foram selecionados 20 de 535 pacientes que, categoricamente, negavam uso abusivo de álcool (a maioria ingeria menos de um

drink por semana). Dos 20 pacientes, 19 tinham peso corporal acima do esperado; 17 tinham hepatomegalia e/ou testes indicativos de lesão e/ou função hepática alterados. Fibrose foi encontrada ao exame histológico na maioria dos casos e cirrose foi diagnosticada em três pacientes. Os autores concluíram que obesidade e *bypass* intestinal (para tratar obesidade mórbida) eram causas específicas de NASH.

Em trabalho de revisão, Andersen e Gluud (1984) analisaram 41 publicações com a finalidade de avaliar, sintetizar e discutir os achados histológicos do fígado em obesos mórbidos. O estudo compreendeu amostra de 1.515 pacientes, dos quais 91% tinham biópsia hepática que integrava protocolo de tratamento cirúrgico prévio de obesidade. A biópsia foi considerada normal em 12% dos casos; a mais frequente anormalidade foi esteatose, presente em 80%; inflamação portal foi também comum (33%); em 29% dos pacientes registrou-se fibrose (portal e periportal); e cirrose foi constatada somente em 3% dos indivíduos. Os autores comentaram que em uma das publicações analisadas (NASRALLAH; WILLS JR.; GALAMBOS, 1981) já se verificara inflamação no parênquima, semelhante à hepatite alcoólica na ausência de consumo de álcool, em 9% de 242 amostras analisadas. Finalmente, apuraram que a prevalência e os tipos de alterações hepáticas em pacientes com obesidade mórbida variam grandemente e citam diversidades nos trabalhos analisados quanto aos objetivos, critérios de inclusão no estudo (de única variável à combinação de diversas) e grande variabilidade na análise histológica, com heterogeneidade de critérios e nomenclatura para a classificação dos achados histológicos.

Comparação clínico-histológica entre a lesão hepática induzida pelo álcool e a lesão “álcool-*like*” encontrada em não alcoolistas foi feita por Diehl, Goodman e Ishak (1988). Nenhuma diferença histológica qualitativa existia entre os dois grupos, embora houvesse intensidade de alguns aspectos histológicos. Parâmetros clínicos e bioquímicos distinguiam os dois grupos muito mais eficientemente do que os aspectos histológicos. O alcoolismo esteve associado a manifestações clínicas e bioquímicas de doença hepática mais grave. De modo geral, a histologia era indistinguível. Fibrose significativa ou cirrose foi encontrada em 38% dos não alcoolistas, embora doença avançada tenha sido clinicamente suspeitada somente em 15%. Os pacientes com lesão “álcool-*like*” eram em grande proporção obesos e diabéticos. Os autores comentaram que, tipicamente

em pacientes com NASH, faltam manifestações clínicas de lesão hepática significativa, apesar de que número substancial deles tinha histologia hepática de doença avançada ou agressiva.

Lee (1989) analisou a biópsia hepática de 49 pacientes com diagnóstico anatomoclínico de NASH. Com base no estudo das amostras do fígado de 13 desses pacientes submetidos à rebiópsia ou necropsia, foi possível concluir que a NASH é doença de curso longo e que evolui lentamente, sendo que as lesões progredem para fibrose e cirrose em reduzida quantidade de pacientes.

No intuito de estabelecer relação entre obesidade e diabetes *mellitus* como fator de risco para a NAFLD e sua progressão, Silverman, Sapala e Appelman (1995) avaliaram a biópsia hepática realizada no ato cirúrgico de *bypass* gástrico em 100 pacientes obesos mórbidos, categorizados conforme o controle glicêmico (tolerância normal à glicose, intolerância e diabetes *mellitus* tipo II). Inferiram que a gravidade da esteatose foi crescente de normoglicêmicos para diabéticos e que alto grau de fibrose e cirrose ocorreu em pacientes com intolerância à glicose e em diabéticos, assim como tendência a desenvolver NASH. Desse modo, lesão hepática significativa correlaciona-se com o grau de controle glicêmico, o que reforça, para os autores, a hipótese de que na obesidade o descontrole glicêmico pode agravar casual lesão hepática preexistente.

Angulo *et al.* (1999) investigaram um grupo de 144 pacientes com diagnóstico de NASH inequivocamente estabelecido, com o objetivo de identificar fatores preditivos de fibrose. Idade mais avançada, obesidade, diabetes *mellitus* e relação aspartato-aminotransferase/ alanina-aminotransferase (AST/ALT) superior a um foram fatores preditivos significativos de fibrose hepática acentuada (fibrose em ponte/cirrose).

Alguns estudos têm sugerido que a NAFLD representa o componente hepático da SM caracterizada por obesidade, hiperinsulinemia, resistência à insulina, diabetes, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial (LIU, 2012; MARCHESINI *et al.*, 1999; RUBINSTEIN; LAVINE; SCHWIMMER, 2008). A resistência à insulina e o alto nível de insulina circulante têm papel central na patogênese da esteatose hepática, sendo descrita como o “primeiro golpe” na gênese da doença (DAY; JAMES, 1998a; DAY; JAMES, 1998b; YOUNOSSI, 1999).

No metabolismo da gordura hepática, os ácidos graxos livres originam-se do tecido adiposo, hidrólise dos quilomícrons e da lipogênese *de novo* (PESSAYRE; MANSOURI; FROMENTY, 2002). Conforme o estado nutricional/hormonal, os ácidos graxos livres podem ser β -oxidados ou reesterificados a triglicerídeos nas mitocôndrias. Os triglicerídeos hepáticos podem ser secretados como proteína de muito baixa densidade (VLDL) e/ou acumular-se no citoplasma dos hepatócitos (CHAO; STIERS; ONTKO, 1986; HEID *et al.*, 1998).

O acúmulo excessivo de gordura nos adipócitos e músculos causa resistência à insulina e contribui para o depósito de gordura no fígado (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). Obviamente, o aumento do influxo de ácidos graxos livres no fígado não ocorre indefinidamente. Com o tempo, desenvolve-se estado de equilíbrio no qual há aumento da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos e cetogênese (SANYAL *et al.*, 2001). A β -oxidação mitocondrial está exacerbada no fígado de camundongos geneticamente modificados (*ob/ob*), com acentuada esteatose (BRADY *et al.*, 1985; LI *et al.*, 2003). Nesse contexto, o papel da leptina como indutor da β -oxidação mitocondrial hepática tem sido postulado, embora o mecanismo seja pouco entendido. Níveis aumentados de leptina têm sido verificados no sangue de pessoas obesas (FRIEDMAN; HALASS, 1998) e com NASH (CHITTURI *et al.*, 2002), apesar de que tal aumento possa refletir estado de resistência não somente em nível central, mas também nos músculos e fígado (CHITTURI *et al.*, 2002). Assim, fica a pergunta: durante quanto tempo o fígado com esteatose se beneficia do aumento da expressão de leptina na obesidade e nos pacientes com NASH?

A oxidação dos ácidos graxos livres e a degradação de outros combustíveis na mitocôndria produzem energia e radicais livres por meio da cadeia respiratória (SALWAY, 1998). O processo bioquímico para geração de energia, o qual se associa à oxidação e redução de cofatores (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – NADH – dinucleotídeo de flavina e adenina - FADH₂) para a fosforilação de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), é conhecido como fosforilação oxidativa. Durante a oxidação na cadeia respiratória, NADH e FADH₂ transferem seus elétrons para combinar com o oxigênio e prótons e formar água, embora uma fração desses elétrons possa reagir diretamente com o oxigênio e formar o radical ânion superóxido. O controle

natural do processo envolve a atividade das enzimas antioxidantes, na qual o radical ânion superóxido é então dismutado pela enzima superóxido dismutase mitocondrial manganese em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e destoxificado em água e gás carbônico pela catalase e, na sua ausência, pela glutathione peroxidase mitocondrial (BANOS *et al.*, 2005; PESSAYRE; MANSOURI; FROMENTY, 2002).

Portanto, na mitocôndria saudável, espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species* (ROS), são naturalmente gerados na cadeia respiratória e baixos níveis de ROS podem sinalizar mecanismo de defesa local, ao ativar as células de Kupffer (TSUKAMOTO, 2002). Outro estudo sugere que H_2O_2 é capaz de induzir sinais moleculares, promovendo comunicação entre a mitocôndria e o citosol (HUGHES; MURPHY; LEDGERWOOD, 2005).

Porém, o desequilíbrio na relação pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante constitui a maior característica do estresse oxidativo, condição esta capaz de desencadear diversos eventos patogênicos no fígado (VIDELA *et al.*, 2004) e disparar a peroxidação lipídica. Isso gera aldeídos reativos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-nonenal (HNE) (ALBANO *et al.*, 2005; CHALASANI *et al.*, 2004; LOGUERCIO *et al.*, 2004), que podem reduzir a função mitocondrial, causar dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (SEKI *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, gerar uma variedade de estímulos celulares com conseqüente resposta inflamatória (ANSTEE; GOLDIN, 2006). O estresse oxidativo, as citocinas pró-inflamatórias, a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia, a hipoadiponectinemia e a apoptose são reconhecidas como o “segundo golpe”, ocasionando a NASH/fibrose (ANSTEE; GOLDIN, 2006; DAY; JAMES, 1998b; MARRA *et al.*, 2008; YOUNOSSI, 1999).

Embora o estresse oxidativo tenha sua importância, a localização e o significado patológico da lesão celular induzida na NAFLD permanecem incertos.

1.1.3 Aspectos gerais do diagnóstico da NAFLD/NASH

Nos últimos anos, tem sido discutida, cada vez mais, a importância do diagnóstico da NAFLD/NASH, considerando-se a alta prevalência da doença e o fato de que a prevalência pode sofrer influência de fatores étnicos, geográficos e

culturais e de critérios para se diferenciar esteatose isoladamente da NASH (MACHADO; MARQUES-VIDAL; CORTEZ-PINTO, 2006).

Na prática clínica, considerando-se que a maioria dos pacientes é assintomática, hepatomegalia pode ser o único achado. Dos marcadores bioquímicos, as enzimas hepáticas mais comumente elevadas são a alanina aminotransferase (ALT) e a gama-glutamil-transpeptidase (GGT). Menos frequente é a elevação da aspartato aminotransferase (AST), que, quando aumentada, pode indicar doença mais avançada com fibrose ou cirrose (ANGULO *et al.*, 1999). Porém, em geral não há correlação significativa entre grau de elevação das aminotransferases e gravidade da NASH e/ou fibrose (BROWNING *et al.*, 2004).

Considerando-se os métodos de imagem, sua principal limitação está em não detectar atividade inflamatória (SAADEH; YOUNOSSI, 2000). A ultrassonografia (US) do abdômen é o exame mais utilizado na prática clínica para diagnóstico da esteatose hepática, pela facilidade da realização e por se tratar de método não invasivo e de baixo custo, quando comparado aos outros métodos de imagem. No entanto, Saadeh e Younossi (2000) demonstraram que a US só apresenta boa acurácia para detectar esteatose quando esta acomete mais de 33% do fígado. Outros estudos revelam sensibilidade de 89% e especificidade de 93% para detecção da esteatose e de 77% e 89%, respectivamente, para se detectar fibrose (ANGULO; LINDOR, 2002). A tomografia computadorizada (TC) também é utilizada na investigação diagnóstica da esteatose, entretanto, não é mais específica que a US e envolve exposição à radiação (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010). A ressonância magnética (RM) é mais sensível do que a US para detectar esteatose e as novas técnicas de RM demonstram excelente valor preditivo para excluir fibrose além de sensibilidade e especificidade de aproximadamente 85% para diferenciar fibrose discreta de grave (YIN *et al.*, 2007). A espectroscopia por RM é hoje o método de imagem com mais acurácia para se diagnosticar NAFLD.

O diagnóstico de NASH se faz com base nos achados da biópsia hepática após cuidadosa exclusão da etiologia alcoólica. Histologicamente, as alterações podem ser indistinguíveis da esteato-hepatite associada ao alcoolismo. Em termos gerais, a lesão na NASH tende a ser menos grave. Os parâmetros para definição e graduação histológica da NASH são ainda variáveis, especialmente no

que concerne ao grau de inflamação, havendo grande variação interobservador ao se relatar aspectos da doença (YOUNOSSI, 1998). Brunt *et al.* (1999) propuseram critérios para graduação da atividade necroinflamatória e estadiamento da fibrose na NASH, com escore para caracterizar a gravidade da doença. Recentemente, Kleiner *et al.* (2005) preconizaram novo sistema de escore histológico para NAFLD/NASH. Entretanto, sua indicação é somente para pacientes com anormalidades clinicamente detectadas, entre elas idade superior a 45 anos, obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2, AST/ALT igual ou superior 1 (ANGULO *et al.*, 1999).

Até o momento a avaliação clínica, bioquímica e os métodos de imagem ainda não são capazes diferenciar NAFLD de NASH com acurácia suficiente para dispensar a biópsia hepática (BRUNT, 2009; WIECHOWSKA; FELDSTEIN, 2008).

1.1.4 Aspectos gerais do tratamento da NAFLD

Tendo-se como base a etiopatogenia da doença, as recomendações do tratamento estão fundamentadas: a) na cirurgia bariátrica; b) no uso de medicamentos combinados; c) na modificação do estilo de vida. Nesse âmbito, recomenda-se reduzir os fatores de risco, na expectativa de se prevenir a evolução da doença (ANGULO; LINDOR, 2002; SANYAL *et al.*, 2001).

Considerando-se que as lesões hepáticas são muito frequentes nos pacientes com obesidade mórbida e que a cirurgia bariátrica é método eficaz na redução do peso corporal, reversão das complicações da SM e regressão da esteatose, da estato-hepatite e até mesmo da fibrose (ANDRADE *et al.*, 2008; COTRIM; DALTRO, 2010; FURUYA *et al.*, 2007; MATTAR *et al.*, 2005), a mesma tem sido proposta como opção de tratamento para a NAFLD/NASH. Porém, a partir de recente revisão sobre o tema, concluiu-se que a forma heterogênea dos estudos clínicos realizados tem impedido a avaliação definitiva dos efeitos benéficos/maléficos da cirurgia bariátrica como abordagem terapêutica dos pacientes com NASH (CHAVEZ-TAPIA *et al.*, 2010).

Até o momento, nenhuma medicação isolada foi aprovada pela *Food and Droug Administration* (FDA) para tratamento da NAFLD (CAVE *et al.*, 2007).

Entretanto, drogas combinadas entre si ou associadas a mudanças no estilo de vida têm sido investigadas.

Os estudos com metformina realizados em pacientes com NASH demonstraram redução das aminotransferases, mas sem melhora significativa sobre a histologia hepática (MARCHESINI *et al.*, 2001; UYGUN *et al.*, 2004).

As tiazolidinedionas, usadas no tratamento do diabetes *mellitus* (DM) por aumentar a sensibilidade à insulina no tecido adiposo, hepático e musculoesquelético (RECTOR *et al.*, 2008), têm sido avaliadas no tratamento da NAFLD/NASH, destacando-se, entre elas, a rosiglitazona e a pioglitazona.

Neuschwander-Tetri *et al.* (2003) avaliaram se a melhora da resistência à insulina teria impacto sobre as alterações histológicas da NASH em grupo de 30 pacientes com sobrepeso e obesidade classe II. Todos receberam 4 mg de rosiglitazona duas vezes ao dia, por 48 semanas. Dos 30 pacientes, 25 finalizaram o protocolo. Os autores concluíram que a melhora na sensibilidade à insulina resultou em redução da fibrose e da esteato-hepatite.

Em estudo randomizado conduzido por 12 meses, Ratziu *et al.* (2008) testaram a eficácia e segurança da rosiglitazona em pacientes com NASH. Os desfechos observados foram: melhora na sensibilidade à insulina, normalização dos níveis das aminotransferases e melhora do escore da esteatose. Discreta redução dos níveis de hemoglobina, ganho de peso e edema dos membros inferiores foram os efeitos adversos encontrados.

Embora os autores acima tenham demonstrado regressão na intensidade das lesões hepáticas, os estudos abaixo associaram a rosiglitazona a risco aumentado de infarto agudo do miocárdio (IAM) e de insuficiência cardíaca.

Em metanálise envolvendo 42 ensaios clínicos de pacientes diabéticos tratados com rosiglitazona e na qual se avaliou o efeito dessa droga sobre a morbidade e mortalidade, observou-se alto risco de IAM e de morte por doenças cardiovasculares em relação aos indivíduos que não usaram a rosiglitazona (NISSEN; WOLSKI, 2007). Devido aos resultados dessa metanálise alertando sobre o risco aumentado de IAM e morte por doenças cardiovasculares associadas ao tratamento com rosiglitazona, Home *et al.* (2009) desenvolveram estudo randomizado, multicêntrico, aberto, que envolveu 4.447 pacientes com DM tipo 2 e controle glicêmico inadequado. Destes, 2.220 receberam rosiglitazona e os demais 2.227 pacientes, combinação de metformina e sulfonilureia e

compuseram o grupo-controle. Os autores concluíram que o tempo de seguimento de 3,75 anos foi insuficiente para evidenciar diferenças entre os tratamentos e que os dados analisados não foram conclusivos para se associar a rosiglitazona ao risco global de hospitalização ou morte por causas cardiovasculares, incluindo-se risco aumento de IAM. Mas observaram associação entre uso da rosiglitazona e risco aumentado de insuficiência cardíaca (HOME *et al.*, 2009).

Quanto à pioglitazona, sua utilização tem sido recomendada no tratamento de pacientes diabéticos com NASH, com nível de evidência B e força 1 (CHALASANI *et al.*, 2012), com base nos resultados dos estudos comentados a seguir. No entanto, sua segurança e eficácia, a longo prazo, precisam ser estabelecidas (CHALASANI *et al.*, 2012).

Promrat *et al.* (2004), com o objetivo de avaliar os efeitos da pioglitazona em pacientes com NASH, investigou amostra com 18 pacientes não diabéticos, que receberam 30 mg/dia de pioglitazona por 48 semanas. Os resultados demonstraram que em 2/3 da amostra houve regressão da esteatose, avaliada por ressonância magnética (RM), além da redução dos níveis de ALT, da insulinemia em jejum e dos níveis séricos de ácidos graxos livres. Entretanto, reforçam que a segurança e benefícios da pioglitazona em longo prazo requerem mais estudos.

Com o intuito de se avaliar o uso de pioglitazona associada à dieta hipocalórica no tratamento da NAFLD, Belfort *et al.* (2006) desenvolveram estudo randomizado, com amostra de 26 pacientes com DM tipo 2 e NASH comprovada por biópsia hepática e grupo-controle de 21 pacientes que recebiam dieta hipocalórica (restrição de 500 kcal/dia). Os resultados demonstraram melhora do controle glicêmico, redução dos níveis das aminotransferases e aumento da sensibilidade hepática à insulina, além de redução na intensidade da esteatose, avaliada por RM.

Sanyal *et al.* (2010) investigaram, em estudo controlado e randomizado, o efeito da pioglitazona associada à vitamina E no tratamento da NASH. Foram realizadas biópsias hepáticas antes e após o tratamento. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos que receberam, por 24 meses, respectivamente: 30 mg/dia de pioglitazona; 800 UI/dia de vitamina E; ou placebo. As drogas combinadas mostraram, em relação ao grupo placebo: redução

significativa no escore NAS (1,9 *versus* 0,5), com melhora da esteatose, inflamação lobular e níveis da AST e ALT.

Considerando-se o estresse oxidativo como agente causador do desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante/antioxidante na NAFLD, as vitaminas antioxidantes têm sido recomendadas para aumentar a concentração de antioxidante não enzimático no tecido hepático. Nesse contexto, tem sido proposta a administração de vitamina E isolada e/ou associada à vitamina C.

Harrisson, Ward e Schenker (2004), com o objetivo de avaliar a eficácia da combinação das vitaminas E e C em reduzir a esteato-hepatite e a fibrose, acompanharam 45 pacientes que receberam, diariamente, 1000 UI de vitamina E e 1.000 mg de C ou placebo, durante seis meses. Os resultados demonstraram redução significativa no escore da fibrose nos pacientes que receberam suplementação vitamínica. Entretanto, não se obteve melhora na atividade necroinflamatória ou nos níveis das aminotransferases.

Os efeitos da vitamina E associada à pioglitazona foram comparados, por Sanyal *et al.* (2001), àqueles da vitamina E isoladamente, em pacientes não diabéticos com NASH. A combinação das drogas produziu redução na intensidade da esteatose e da balonização hepatocitária, queda nos níveis de ácidos graxos livres e da insulinemia de jejum, quando comparada ao grupo que utilizou a vitamina E isoladamente.

Outros antioxidantes, como a betaína e a pentoxilina, requerem mais estudos para melhor avaliar o potencial terapêutico na NAFLD (LI *et al.*, 2011; YOUNOSSI, 2008).

Drogas como fenofibrato mostraram melhora dos parâmetros metabólicos e bioquímicos, mas não na histologia hepática (FERNANDEZ-MIRANDA *et al.*, 2008). Ácido ursodesoxicólico também não ressaltou efeito sobre a histológica hepática (LINDOR *et al.*, 2004). O uso de ômega-3 associou-se à redução das enzimas hepáticas e intensidade da esteatose, avaliada por US (ZHU *et al.*, 2008).

A modificação no estilo de vida (exercícios físicos e dieta hipocalórica) tem sido reconhecida como primeira linha no tratamento para NAFLD. Em sua maioria, os pacientes com NAFLD têm SM e resistência periférica à insulina e são sedentários, além de consumirem grande quantidade de alimentos ricos em gordura saturada e carboidratos simples. Assim, muito do conhecimento aplicado

ao tratamento da NAFLD está embasado na prevenção/tratamento do DM, controle da SM e intervenções no estilo de vida.

O estudo que melhor comprova esse aspecto foi desenvolvido por Knowler *et al.* (2002), no qual se demonstrou que a mudança do estilo de vida (150 minutos de atividade física por semana e redução de 7% do peso corporal) foi eficaz na redução da resistência à insulina e diminuição da chance de desencadeamento de DM.

Em diversos outros estudos realçou-se redução dos níveis das aminotransferases e da intensidade da esteatose em resposta à perda de peso (ANDERSEN *et al.*, 1991; SUZUKI *et al.*, 2005; UENO *et al.*, 1997; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Porém, a avaliação hepática nesses ensaios clínicos foi realizada pela US ou RM.

Em recente revisão sistematizada de 15 estudos controlados e randomizados, Wang *et al.* (2010) verificaram que a perda de peso melhorou a NAFLD; no entanto, em mais da metade desses estudos os resultados não foram confirmados por análise da histologia hepática. Os autores concluíram que, apesar da aceitação geral de que a redução do peso corporal é uma terapia eficaz para a NAFLD, não foi possível apoiar ou refutar essa recomendação com base nos dados analisados.

Para responder a essa questão, Promrat *et al.* (2010) avaliaram a eficácia dos exercícios físicos combinados à dieta hipocalórica sobre a NAFLD. A amostra foi randomizada e os pacientes acompanhados por um ano. Os autores concluíram que a magnitude da perda de peso teve correlação forte com a melhora nos níveis da ALT, da intensidade da esteatose e escore da atividade da NASH, sendo necessária redução do peso corporal de no mínimo 7% para obter-se regressão no escore clínico da NAS.

O impacto dos exercícios físicos *per se* tem sido investigado na NAFLD e os estudos epidemiológicos e de intervenção têm salientado mais prevalência de NAFLD entre os sedentários quando comparados aos praticantes de exercícios.

Hsieh *et al.* (1998) analisaram a prevalência de NAFLD entre praticantes ou não de exercícios físicos. A amostra foi constituída de 3.331 japoneses com idade média de 48,3 anos e peso corporal normal (IMC médio =23,3 kg/m²). A prevalência da NAFLD foi significativamente mais elevada no grupo sedentário comparado ao grupo que praticou exercícios aeróbicos em dois a três ou mais

dias por semana. Em outra pesquisa, na qual se avaliou a eficácia dos exercícios aeróbicos em 3.789 mulheres com sobrepeso (IMC=27,6 kg/m²) e idade média de 69,9 anos, apurou-se redução da ALT e GGT, sem alteração do peso corporal (LAWLOR *et al.*, 2005).

Zelber-Sagi *et al.* (2008) examinaram o impacto da atividade física sobre os parâmetros histológicos na NAFLD em 375 pacientes. Os autores concluíram que os exercícios físicos podem desempenhar papel protetor na NAFLD, sendo que esse benefício pareceu ser mediado por redução da obesidade abdominal.

Os efeitos das mudanças na atividade física sobre o perfil metabólico e enzimas hepáticas foram investigados por St George *et al.* (2009) em 141 pacientes com NAFLD, acompanhados por três meses. A prática de exercícios por 150 minutos/semana melhorou os níveis das enzimas hepáticas e outros parâmetros cardiometabólicos em comparação aos pacientes menos ativos. Esse efeito foi verificado independentemente da perda de peso. Redução significativa da adiposidade visceral e dos níveis de triglicerídeos hepáticos, sem alteração do peso corporal, foi também enfatizada em resposta à realização de exercícios aeróbicos no estudo de Johnson *et al.* (2009).

Embora haja fortes evidências de que a perda de peso associada ou não à atividade física melhore os parâmetros histológicos na NAFLD, as investigações em modelos experimentais, por permitirem o controle da heterogeneidade genética, fatores ambientais e estilo de vida, podem favorecer a compreensão dos mecanismos envolvidos na melhora da NAFLD associada à prática de exercícios e abrir novas possibilidades de pesquisas em humanos.

Ressalta-se que não foram encontradas publicações que tenham avaliado o impacto do treinamento físico sobre os níveis de peroxidação lipídica hepática em modelo experimental de obesidade associada à NAFLD.

1.1.5 Modelos experimentais de obesidade à NAFLD induzidas por dieta

A NAFLD envolve a interação de fatores genéticos e ambientais (DAY, 2002), o que dificulta o seu estudo em humanos, não só pela heterogeneidade genética da população, mas também pela diversidade de interação entre as características genéticas e fatores ambientais (DAY; JAMES, 1998a).

Compartilhando muitas semelhanças fisiológicas, anatômicas e metabólicas com o ser humano, o rato de laboratório tem sido adotado como modelo primário para investigação de diversas doenças, considerando-se que estudos clínicos muitas vezes são inviáveis por questões éticas, financeiras e metodológicas (HALL *et al.*, 1993). Adicionalmente, estudos experimentais permitem resposta em curto período de tempo. Por exemplo, considerando-se as alterações do peso corporal, 10 dias de vida de um rato equivalem, aproximadamente um ano em humanos (Dieme *et al.*, 2006). Foi estudando a NASH em modelo animal que Day e James (1998b), propuseram a hipótese “*two-hit*” para a patogênese da NASH que é base para a investigação neste domínio (DAY; JAMES, 1998b).

Dessa forma, as abordagens nutricionais para estudos experimentais na NAFLD têm sido direcionadas para o acúmulo de gordura hepática, seja pela deficiência e/ou limitação de nutrientes, com conseqüente interferência na secreção de VLDL, resultando em redução na exportação dos lipídeos, ou por dietas que promovem a superalimentação, como aquelas com alto teor de lipídios, de carboidratos simples (frutose e sacarose) ou combinada, conhecidas como “dieta de cafeteria”, que induzem a lipogênese, acarretando o aumento da síntese e importação de lipídios e, conseqüentemente esteatose.

A dieta deficiente em colina e metionina (MCD) é um modelo conhecido para estudo da NASH, muita embora tenha recebido críticas por não reproduzir os componentes essenciais da doença em humanos. Assim, o perfil metabólico é oposto ao encontrado na clínica, ou seja, o rato tem perda de peso significativa, baixa glicemia, sensibilidade periférica à insulina, baixos níveis séricos de insulina e, leptina e manutenção ou aumento dos níveis de adiponectina sérica (LECLERCQ *et al.*, 2007; RINELLA; GREEN, 2004).

Com o intuito de desenvolver um modelo experimental de NASH, Lieber *et al.* (2004) estudaram em ratos *Sprague-Dawley* o impacto de uma dieta líquida com alto teor de gordura (71% de energia de gordura, 11% de hidratos de carbono, 18% de proteínas) em comparação com a dieta padrão (35% de energia de gordura, 47% de hidratos de carbono e 18% de proteína). As dietas foram fornecidas “*ad libitum*”. Os resultados revelaram que os ratos que receberam a dieta rica em gordura reproduziram as principais características de NASH, quais sejam esteatose, inflamação, aumento do fator de necrose tumoral, do estresse oxidativo e da insulina.

Considerando-se que a NAFLD é manifestação hepática da SM, e que a dieta enriquecida com frutose é adequada para se induzir essa síndrome, os animais de laboratório alimentados com a referida dieta são reconhecidos como um bom modelo de SM associada a NAFLD (DHINGRA *et al.*, 2007). Em estudo envolvendo ratos *Wistar* alimentados com dieta rica em frutose (70%) por cinco semanas observou-se esteatose macrovesicular na zona 1 do ácino hepático, inflamação intralobular, aumento do peso corporal e das concentrações de triglicérides, em comparação ao grupo-controle (KAWASAKI *et al.*, 2009).

Ackerman *et al.* (2005), utilizando-se de ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta enriquecida com frutose (60%), demonstraram esteatose macro e microvacuolar. Outro estudo mostrou que ratos *Wistar* albino que receberam dieta líquida à base de água potável e 10% de frutose por 10 dias também desenvolveram esteatose macrovesicular, mas não inflamação.

Com o objetivo de se avaliar se a combinação de frutose e glicose e, o uso da sacarose isoladamente produziam efeitos diferentes na indução da NAFLD em ratos *Sprague-Dawley*, Sánchez e Lozada *et al.* (2010) alimentaram ratos com a combinação de 30% de frutose e 30% de glicose (grupo GF) ou 60% de sacarose (grupo S) ou dieta padrão (GC) durante quatro meses. Os resultados demonstraram que os ratos alimentados com frutose e glicose e aqueles que receberam sacarose apresentaram aumento de peso corporal, além das características sistêmicas da SM, como elevação dos triglicérides e desenvolvimento de resistência insulina. Os autores também constataram esteatose e discreta inflamação nas áreas periportais hepática nos ratos que utilizaram as dietas com carboidratos.

De fato, tanto em humanos como em roedores, a dieta com adição de carboidratos simples é reconhecida como altamente palatável, associando-se a aumento significativo do consumo alimentar, com conseqüente ganho de peso corporal, aumento do tecido adiposo, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptnemia. Associa-se também aumento nas taxas de obesidade, DM, hipertensão arterial e NAFLD, entre outras doenças (MARCHESINI; BANBINE, 2006; MELANSON *et al.*, 2007).

Harold *et al.* (2000), utilizando-se de uma dieta descrita como altamente palatável, concluíram que a dieta foi fator crítico na determinação da suscetibilidade à obesidade dietética em ratos *Wistar* não selecionados. Naderali,

Fatani e Williams (2004), também em estudo experimental com ratos *Wistar* machos, utilizaram mesmo modelo de dieta rica em sacarose (glicose e frutose), 33% ração padrão de biotério, 33% leite condensado Nestlé®, 7% sacarose e 27% de água, pelo período de 15 semanas. Demonstrando a eficiência da dieta no aumento do ganho de peso dos ratos em relação ao grupo alimentado com a dieta padrão.

Considerando-se a necessidade de se determinar parâmetros antropométricos capazes de comprovar obesidade/obesidade central em ratos, Novelli *et al.* (2007) realizaram pesquisa com ratos *Wistar* de 60 dias de idade e que receberam dieta controle, dieta líquida com sacarose 30%, dieta acrescida de carboidratos. Os resultados demonstraram que a obesidade foi verificada nos ratos que receberam dieta líquida com sacarose e rica e acrescida de carboidratos. Foram observados aumento do IMC e da circunferência torácica, sendo tais parâmetros indicadores das consequências adversas da obesidade como, dislipidemia e estresse oxidativo.

Assim, embora a literatura evidencie esteatose em modelos animais, é menos frequente nesses modelos a esteato-hepatite, que além da esteatose caracteriza-se pela presença de balonização hepatocelular e infiltrado inflamatório, diferindo das características morfológicas encontradas em humanos, principalmente pela aparência histológica grosseira (ANSTEEN; GOLDIN, 2006). Também nesses modelos nem sempre há descrição das alterações metabólicas observadas no homem, tais como obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, entre outras.

2 OBJETIVOS

Em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em carboidrato simples, altamente palatável, foram definidos os seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

Estudar parâmetros antropométricos, metabólicos e marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes hepáticos na NAFLD induzida por obesidade, avaliando, em subgrupo de animais com obesidade estabelecida, o impacto do treinamento físico sobre as variáveis em estudo, especialmente sobre a peroxidação lipídica hepática.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever os parâmetros antropométricos, bioquímicos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações) e hormonais (insulina e leptina) em ratos *Wistar* submetidos à dieta rica em carboidrato simples e compará-los àqueles de grupo-controle alimentado com dieta padrão, periodicamente, durante 30 semanas.
- Identificar os parâmetros antropométricos, bioquímicos (glicose, triglicerídeos, colesterol total e frações) e hormonais (insulina e leptina) em ratos *Wistar* submetidos ou não à dieta rica em carboidrato simples e que realizaram treinamento físico em comparação ao grupo-controle que não se submeteu a treinamento físico.
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase) e a expressão de leptina e obr-leptina no fígado de ratos *Wistar* submetidos à dieta rica em carboidrato simples e compará-las àqueles de grupo-controle alimentado com dieta padrão, periodicamente, durante 30 semanas.

- Estabelecer os achados histológicos do fígado de ratos *Wistar* submetidos à dieta rica em carboidrato simples e compará-los àqueles de grupo-controle alimentado com dieta padrão, periodicamente, durante 30 semanas.
- Avaliar os níveis de peroxidação lipídica hepática em um subgrupo de ratos submetidos à dieta rica em carboidrato simples e treinamento físico em comparação ao grupo-controle alimentado com dieta padrão e não submetido a treinamento físico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo experimental realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição (protocolo nº 53/2007) (ANEXO A).

3.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos, com 28 dias de vida (logo após o desmame). Eles foram pesados, medidos e separados aleatoriamente nos seguintes grupos: grupo-controle (GC), formado por 30 ratos submetidos à dieta padrão de biotério (descrita mais adiante), por cinco (GC5, seis ratos), 10 (GC10, seis ratos), 20 (GC20, seis ratos) e 30 (GC30, 12 ratos) semanas, respectivamente; e grupo experimental (GE), composto de 30 ratos submetidos à dieta altamente palatável (descrita mais adiante) por cinco (GE5, seis ratos), 10 (GE10, seis ratos), 20 (GE20, seis ratos) e 30 (GE30, 12 ratos) semanas, respectivamente. Da 25^a à 30^a semana, 12 animais pertencentes aos grupos GC30 (GC30ex, seis ratos) e GE30 (GE30ex, seis ratos) foram submetidos à atividade física. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, ambiente higiênico, com temperatura, umidade e claridade controladas e com livre acesso a água e alimento.

Um rato pertencente ao GC20 veio a falecer, motivo pelo qual foi excluído de toda a análise.

3.2 Dieta

Os animais dos GC alimentaram-se de dieta padrão (NUVILAB-CR1 Nuvital-Colombo, Brasil), com a seguinte composição nutricional: proteína 22%; lipídios 4%; carboidratos 42%; minerais 10%; fósforo 0,8%; vitaminas 1%; fibras

8%; umidade 12,5%. À análise bromatológica, 100 g de matéria seca da dieta continham: 309 kcal; proteína 24,8 g; lipídios 3,4 g; carboidratos 44,8 g; resíduo mineral fixo 8,2 g; fibra alimentar 18,8 g. Aqueles do GE alimentaram-se de dieta reconhecida como eficiente para produção de obesidade em ratos, descrita como altamente palatável, com a seguinte composição nutricional: 33% de *pellet* de ração NUVILAB-CR1 reduzidas a pó, 33% de leite condensado (MOÇA, Nestlé®, Brasil), 7% de açúcar refinado, União®, Brasil) e 27% de água (HAROLD *et al.*, 2000). O leite condensado tem a seguinte informação nutricional: carboidrato 56,7%; lipídios 8,3%; proteínas 6,7%; água 28,3%. A análise bromatológica da dieta gerou a seguinte informação nutricional por 100 g de matéria seca: 339 kcal; proteína 16,1 g; lipídios 3,4 g; carboidratos 61,0 g; resíduo mineral fixo 5,1 g; fibra alimentar 14,4 g.

A dieta, preparada diariamente, era fracionada em pequenas porções pesadas e acondicionadas em comedouro específico, entre oito e 10 horas. O alimento restante no comedouro era pesado para se calcular a quantidade final de alimento ingerido. A água dos bebedouros era renovada diariamente.

3.3 Aferições das medidas antropométricas

Semanalmente eram aferidos o peso, a circunferência torácica (CT) – medida entre a pata dianteira e a pata traseira – e o comprimento nasoanal e calculado o IMC – razão entre peso (g) e comprimento ao quadrado (cm²) (NOVELLI *et al.*, 2007).

3.4 Treinamento físico

Todos os animais foram aclimatados para o exercício na esteira motorizada (Gaustec, Belo Horizonte, MG, Brasil) à velocidade de 10 m/1min, inclinação de 5%, cinco minutos por dia por cinco dias consecutivos. O objetivo desse exercício preliminar era mostrar aos animais a direção da execução. Após o exercício de familiarização, os ratos foram submetidos ao protocolo de treinamento físico, que consistia em correr em sessões com aumento gradual de intensidade e

velocidade até que fossem capazes de correr 25 m/1min, com inclinação de 5% por 60 minutos/dia. A realização da intensidade do exercício garante efeito de resistência. Para assegurar que todos os animais fossem submetidos ao mesmo tratamento, um grupo sedentário foi submetido ao mesmo protocolo (PRIVIERO *et al.*, 2004).

3.5 Sacrifício dos animais, coleta e preparo do material biológico

Ao final de cada tempo do experimento, após jejum de 10 horas, os animais foram sacrificados com dose letal de fenobarbital sódico. Amostras de sangue (aproximadamente 1,0 mL) foram colhidas por punção da aorta, colocadas em frascos contendo heparina e também sem anticoagulantes e estocados a -20°C. Os fígados foram imediatamente retirados e pesados. Fragmentos com quase 1 mm de espessura eram fixados em formaldeído a 4%, desidratados em soluções de concentração crescente de etanol, imersos em xilol e, a seguir, incluídos em parafina.

3.6 Dosagens bioquímicas e de hormônios no sangue

As dosagens de glicose, colesterol total, colesterol VLDL, colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL) e colesterol HDL e triglicerídeos (Bioclin, Quimbasa - Química Básica Ltda, Brasil) foram realizadas conforme recomendação do fabricante (*autoanalyzer 2300 STATplus, Yellow Spring Inst, USA*).

As concentrações plasmáticas de leptina e de insulina foram determinadas por radioimunoensaio (Rat Leptin Ria Kit, Rat Insulina Ria Kit - LINCO Research, Missouri, USA), empregando-se contador de Raios-gama (ANSR-ABBOT, USA). O valor mínimo de detecção era de 0,5 ng/mL.

3.7 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Deierterich *et al.* (2000). Esse ensaio consiste na adição de 0,04 mL de homogeneizado, que foi adicionado ao tampão fosfato de sódio 50 mM (1 mL, potencial hidrogeniônico - pH 7.8 a 37°C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriamino-pentacético (DTPA). A reação foi iniciada com a adição de 2 mM de pirogalol e as leituras realizadas durante três minutos a 420 nm (espectrofotômetro Hitachi, Japão). A atividade da SOD foi calculada em unidades por miligrama de proteína, em que uma unidade de enzima foi considerada como sendo a quantidade que causou a inibição da autoxidação do pirogalol em 50%.

A atividade da catalase foi praticada conforme o método de Nelson e Kiesov (1972), com algumas modificações. Foram adicionados 2 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e alíquotas do homogeneizado (0,06 mL). A reação foi iniciada com a adição de 0,04 mL de H₂O₂ (0,3 M) e a leitura realizada em 240 nm (espectrofotômetro Hitachi, Japão) a 25°C. A atividade da catalase foi calculada em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína, ΔE = variação da absorbância. A reação ocorreu em um minuto à temperatura ambiente. A decomposição de H₂O₂ pela catalase foi avaliada pela alteração da absorbância a 240 nm. Os experimentos foram feitos em duplicata.

3.8 Dosagem do ácido tiobarbitúrico (TIBARS)

O teste do TIBARS é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, como o malondialdeído, que é um dos principais produtos formados no processo oxidativo (cisão beta dos ácidos graxos polinsaturados). De fácil utilização, esse método fornece informações sobre a extensão da peroxidação lipídica em sistema simples *in vitro* (ESTERBAUER *et al.*, 1984).

Assim, os níveis de TIBARS foram determinados conforme descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) e Janero (1990). A dosagem foi realizada no mesmo dia do sacrifício dos animais. Fragmento de fígado foi homogeneizado em solução salina tamponada (do inglês, *phosphate buffered saline* [PBS]) pH 7,0 e

centrifugado por 10 minutos a 5,000 g. Posteriormente, alíquotas do homogeneizado (0,01 mL) foram adicionadas a 0,02 mL de dodecyl sulfato de sódio (SDS) 8,1%, 0,05 mL de ácido acético (pH 3,4) 2,5 M, 0,05 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi incubada por 60 minutos a 95°C. As leituras das amostras foram feitas a 532 nm (espectrofotômetro Hitachi, Japão). A concentração de MDA produzida foi expressa em nanomoles de MDA por miligrama de proteína (nMol MDA/mg proteína) e foi interpretada como os níveis de TIBARS.

3.9 Avaliação histológica

Do material incluído em parafina foram feitos cortes histológicos com 4 µm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson, prata amoniacal de Gomori, Perls e reação esterásica para identificação de neutrófilos. Na avaliação histológica foram investigados: esteatose macro e microvacuolar, balonização hepatocelular e sua localização no ácino hepático. A avaliação histológica foi feita conjuntamente por dois observadores, conforme protocolo da instituição.

3.10 Expressão hepática de malondialdeído, obr-leptina e leptina

A expressão hepática de MDA, Ob-R e leptina foram avaliadas por imunohistoquímica nos animais dos GE e GC sacrificados com 20 e 30 semanas. Do material incluído em parafina foram colhidos, em lâminas salinizadas, cortes de 4 µm de espessura, os quais foram desparafinizados e hidratados. Para a reação imunohistoquímica foi realizada reativação antigênica com DTPA, pH 8.0, no *steamer* por 30min a 98°C, seguida de lavagem em tampão Tris ácido clorídrico - HCl - pH 7.6. Todo o procedimento foi realizado usando-se o *kit* Sistema de Detecção de Polímeros (NovoLink™ *Polymer Detection System*, Novocastra, USA). Os anticorpos primários usados foram: anticorpo antiMDA monoclonal (1F83) (Cosmo Bio Co. Ltd, JPN), na diluição de 0,5 µg/mL; Ob-R (H-300) sc-

8325 e Ob (A-20) sc-842 (Sta. Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) na diluição de 1:100 e 1:250, respectivamente.

3.11 Análise estatística

Todas as características em estudo foram descritas. Utilizaram-se frequências e porcentagens para descrição das diversas variáveis categóricas e medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão e intervalo interquartilico) para as contínuas. Para as análises de correlação foram empregados os coeficientes de Pearson ou Spearman quando indicado.

Para cada uma das variáveis-resposta quantitativas em estudo foram desenvolvidos modelos de regressão linear em que seriam inicialmente incluídas todas as variáveis com valor-p $\leq 0,25$ à análise univariada. Entretanto, por apresentarem alto nível de correlação entre as covariáveis explicativas, optou-se por ajustar o modelo final às covariáveis: grupo, exercício, Δ IMC (representante das medidas antropométricas) e Δ Kcal (representante das medidas de ingestão alimentar).

Para as variáveis-resposta categóricas (balonização e esteatose) foram desenvolvidos modelos de regressão logística. No modelo inicial foram incluídas todas as variáveis com valores-p $< 0,25$ à análise univariada. Em seguida, foram retiradas, uma a uma, as características que apresentaram alto valor-p até que restassem apenas aquelas com significância estatística (valor-p $\leq 0,05$) e também com significado clínico. A adequação do modelo foi avaliada a partir do teste de Hosmer-Lemeshow.

A análise multivariada foi feita empregando-se o *software* R, de domínio público. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, Z. *et al.* Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. **Hypertension**, Dallas, v. 45, p. 1012-8, 2005.
- ADLER, M.; SCHAFFNER, F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. **Am J Med**, New York, v. 67, p. 811-6, 1979.
- 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**, London, v. 54, n. 7, p. 987-93, 2005.
- ANDERSEN, T. *et al.* Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 12, n. 2, p. 224-9, 1991.
- ANDERSEN, T.; GLUUD, C. Liver morphology in morbid obesity: a literature study. **Int J Obes**, London, v. 8, p. 97-106, 1984.
- ANDRADE, A.R. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese individuals: the influence of bariatric surgery. **Ann Hepatol**, México, v. 7, n. 4, p. 364-8, 2008.
- ANGULO, P. *et al.* Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 30, p. 1356-62, 1999.
- ANGULO, P.; LINDOR, K.D. Non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 17, p. S186-90, 2002.
- ANSTEE, Q.M.; GOLDIN, R.D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**, Oxford, v. 87, p. 1-16, 2006.
- ARMUTCU, F. *et al.* Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. **Clin Biochem**, Toronto, v. 38, p. 540-7, 2005.
- BANOS, G. *et al.* Activities of antioxidant enzymes in two stages of pathology development in sucrose-fed rats. **Can J Physiol Pharmacol**, Ottawa, v. 83, p. 278-86, 2005.
- BEGRICHE, K. *et al.* Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 6, p. 1-28, 2006.
- BELFORT, R. *et al.* A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med**, Boston, v. 355, n. 22, p. 2297-307, 2006.

BRADY, L.J. *et al.* Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. **Biochem J**, London, v. 231, p. 439-44, 1985.

BRAY, G.A. Complications of obesity. **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 103, n. 6, p. 1052-62, 1985.

BRAY, G.A.; NIELSEN, S.J.; POPLIN, B.M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 79, p. 537-43, 2004.

BROWNING, J.D. *et al.* Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. **Am J Gastroenterol**, New York, v. 99, n. 2, p. 292-8, 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.

BRUNT, E.M. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 4, p. 533-44, Nov. 2009. doi: 10.1016/j.cld.2009.07.008.

CAVE, M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **J Nutr Biochem**, Stoneham, v. 18, n. 3, p. 184-95, Mar. 2007.

CHALASANI, N. *et al.* American Gastroenterological Association. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 142, n. 7, p. 1592-609, 2012.

CHALASANI, N. *et al.* Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 126, n. 5, p. 1287-92, 2004.

CHAO, F.F.; STIERS, D.L.; ONTKO, J.A. Hepatocellular triglyceride synthesis and transfer to lipid droplets and nascent very low density lipoproteins. **J Lipid Res**, Bethesda, v. 27, p. 1174-81, 1986.

CHAVEZ-TAPIA, N.C. *et al.* Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 20, n. 1, 2010.

CHITTURI, S. *et al.* Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? **Hepatology**, Baltimore, v. 36, p. 403-9, 2002.

CORNIER, M.A. *et al.* The metabolic syndrome. **Endocr Rev**, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 777-822, 2008.

COTRIM, H.P.; DALTRO, C. Liver: Does bariatric surgery reduce the severity of NAFLD? **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, London, v. 7, n. 1, p. 11-3, 2010.

DAY C.P.; JAMES O.F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**, Baltimore, v. 27, n. 6, p.1463-6, 1998a.

DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, Baltimore, v. 114, p. 842-5, 1998b.

DAY C.P. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, London, v. 16, n. 5, p. 663-78, 2002.

DHINGRA R. *et al.* Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**. Dallas, 116(5):480-8. 2007 Erratum: **Circulation**, Dallas, v. 116, n. 23, p. 557, 2007.

DIEHL, A.M.; GOODMAN, Z.; ISHAK, K.G. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 95, p. 1056-62, 1988.

DIETERICH, S. *et al.* Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, Dallas, v. 101, n. 1, p. 33-9, 2000.

DIXON, J.B.; BHATHAL, P.S.; O'BRIEN, P.E. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 121, p. 91-100, 2001.

ELLIOTT, S.S. *et al.* Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 76, p. 911-22, 2002.

ESTERBAUER, H. *et al.* Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 319-28, 1984.

FASSIO, E. *et al.* Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. **Hepatology**, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 820-6, Oct. 2004.

FERNÁNDEZ-MIRANDA, C. *et al.* A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Dig Liver Dis**, Roma, v. 40, n. 3, p.200-5, 2008.

FINELLI, C.; TARANTINO, G. Is there any consensus as to what diet or lifestyle approach is the right one for NAFLD patients? **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2012.

FORD, E.S. *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adolescents using the definition from the International Diabetes Federation. **Diab Care**, v. 31, n. 3, p. 587-9, Mar. 2008.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, London, v. 395, p. 763-70, 1998.

FURUYA JR., C.K. *et al.* Effects of bariatricsurgery on nonalcoholic fatty liver disease: preliminary findings after 2 years. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 22, n. 4, p. 510-4, 2007.

HALL J.E. *et al.* Obesity-induced hypertension. Renalfunction and systemic hemodynamics. **Hypertension**, Dallas, v. 22, n. 3, p. 292-9, 1993.

HAROLD, J.A. *et al.* Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 279, n. 2, p. E340-7, 2000.

HARRISON, S.A.; WARD, J.A.; SCHENKER S. The role of vitamin E and C therapy in NASH. **Am J Gastroenterol**, v. 99, n. 9, p. 1862, Sep. 2004.

HEID, H.W. *et al.* Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 294, p. 309-21, 1998.

HOME, P.D. *et al.* Record study team. Rosiglitazone evaluated forcardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (Record): a multicentre, randomised, open-label trial. **Lancet**, London, v. 373, n. 9681, p. 2125-35, 2009.

HSIEH, S.D. *et al.* Regular physical activity andcoronary risk factors in Japanese men. **Circulation**, Dallas, v. 97, n. 7, p. 661-5, 1998.

HUGHES, G.; MURPHY, M.P.; LEDGERWOOD, E.C. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. **Biochem J**, London, v. 389, n. Pt 1, p. 83-9, 2005.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med**, v. 9, n. 6, p. 515-40, 1990.

JANSSEN, I.; KATZMARZYK, P.T.; ROSS, R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 162, n. 18, p. 2074-9, Oct. 2002.

JOHNSON, N.A. *et al.* Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. **Hepatology**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 1105-12, 2009.

KATSUKI, A. *et al.* Increased visceral fat and serum levels of triglyceride are associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal weight subjects with normal glucose tolerance. **Diab Care**, v. 26, n. 8, p. 2341-4, 2003.

KAWASAKI, T. *et al.* Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. **J Nutr**, Philadelphia, v. 139, n. 11, p. 2067-71, 2009.

KLEINER, D.E. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 41, n.6, p. 1313-21, 2005.

KNOWLER, W.C. *et al.* Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, Boston, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2002.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, London, v. 404, p. 635-43, 2000.

LAWLOR, D.A. *et al.* The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. **Am J Epidemiol**, Baltimore, v. 161, n. 11, p. 1081-8, 2005.

LECLERCQ I.A. *et al.* Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. **Lab Invest**, Baltimore, v. 87, n. 1, p. 56-65, 2007.

LEE, R.G. Nonalcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 20, p. 594-98, 1989.

LI, Z. *et al.* Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 37, p. 343-50, 2003.

LI, W. *et al.* Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Lipids Health Dis**, v. 8, p. 10:49, Apr. 2011. doi: 10.1186/1476-511X-10-49.

LIEBER, C.S. *et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Clin Nutr**, Bethesda v. 79, p. 502-9, 2004.

LIMA, M.L. *et al.* Hepatic histopathology of patients with morbid obesity submitted to gastric bypass. **Obes Surg**, Oxford, v. 15, p. 661-9, 2005.

LINDOR, K.D. *et al.* Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. **Hepatology**, Baltimore, v. 39, n. 3, p. 770-8, 2004.

LIU, C.J. Prevalence and risk factors for NAFLD in Asian people who are not obese. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 27, n. 10, p. 1555-60, 2012.

LIU, Y.J. *et al.* Molecular and genetic mechanisms of obesity: implications for future management. **Curr Mol Med**, v. 3, n. 4, p. 325-40, 2003.

LOGUERCIO, C. *et al.* Italian AISF Clinical Group. Non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre clinical study by the Italian Association for the Study of the Liver. **Dig Liver Dis**, Roma, v. 36, p. 398-405, 2004.

LUDWIG, J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin Proc**, Rochester, v. 55, p. 434-8, 1980.

MACHADO, M.; MARQUES-VIDAL, P.; CORTEZ-PINTO, H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 45. n. 4, p. 600-6, 2006.

MARCHESINI G.; BABINI M. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Minerva Cardioangiol**, Torino, v. 54, n. 2, p. 229-39, 2006.

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

MARCHESINI, G. *et al.* Melchionda n.metformin in non-alcoholic steatohepatitis. **Lancet**, London, v. 358, n. 9285, p. 893-4, 2001.

MARRA, F. *et al.* Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. **Trends Mol Med**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 72-81, 2008.

MATTAR, S.G. *et al.* Surgically-induced weight loss significantly improves nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 242, n. 4, p. 610-7, 2005.

MATTEONI, C.A. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 116, p. 1413-9, 1999.

MELANSON K.J. *et al.* Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. **Nutrition**, Burbank, v. 23, n. 2, p. 103-12, 2007.

MONTEIRO, C.A. *et al.* Shifting obesity trends in Brazil. **Eur J Clin Nutr**, London, v. 54, p. 342-6, 2000.

MUSSO, G. *et al.* Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. **Diab Care**, v. 31, n. 3, p. 562-8, Mar. 2008.

NADERALI E.K.; FATANI S.; WILLIAMS G.; Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 63-9, 2004.

NASRALLAH, S.M.; WILLS JR., C.E.; GALAMBOS, J.T. Hepatic morphology in obesity. **Dig Dis Sci**, New York, v. 26, p. 325-27, 1981.

NELSON. D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analyt Biochem**, v. 49, v. 2, p. 474-8, 1972.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A.; CALDWELL, S.H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, Baltimore, v. 37, p. 1202-19, 2003.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. *et al.* Interim results of a pilot study demonstrating the early effects of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone on insulin sensitivity, aminotransferases, hepatic steatosis and body weight in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 38, n. 4, p. 434-40, 2003.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **N Engl J Med**, Boston, v. 357, n. 1, p. 10, 2007.

NOVELLI, E.L. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, London, v. 41, n. 1, p. 111-9, 2007.

OGDEN, C.L. *et al.* Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**, Chicago, v. 295, n. 13, p. 1549-55, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, 1979.

PESSAYRE, D.; MANSOURI, A.; FROMENTY, B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liv Physiol**, v. 282, p. 193-9, 2002.

PRIVIERO, F. *et al.* Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training. **Clin Experim Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 10, p. 741-3, 2004.

PROMRAT, K. *et al.* A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 188-96, 2004.

PROMRAT, K. *et al.* Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, Baltimore, v. 51, n. 1, p. 121-9, 2010.

RATTARASARN, C. *et al.* Regional abdominal fat distribution in lean and obese Thai type 2 diabetic women: relationships with insulin sensitivity and cardiovascular risk factors. **Metabolism**, Baltimore, v. 52, n. 11, p. 1444-7, 2003.

RATZIU, V. *et al.* Study Group. Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 100-10, 2008.

RAVUSSIN, E. A neat way to control weight? **Science**, Washington, p. 307-530, 2005.

RECTOR, R.S. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 2, p. 185-92, 2008.

RINELLA M.E.; GREEN R.M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 40, n. 1, p. 47-51, 2004.

RUBINSTEIN, E.; LAVINE, J.E.; SCHWIMMER, J.B. Hepatic, cardiovascular, and endocrine outcomes of the histological subphenotypes of nonalcoholic fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, New York, v. 28, p. 380-5, 2008.

SAADEH, S.; YOUNOSSI, Z.M. The spectrum of nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. **Cleve Clin J Med**, v. 67, n. 2, p. 96-7, 2000.

SALWAY, J.G. Glicogen metabolism. In: SALWAY, J.G. **Metabolism at a glance**. 4. ed. London: Blackwell Science, p. 58-59, 1998.

SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. *et al.* Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. **Eur J Nutr**, Darmstadt, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2010.

SANYAL, A.J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 120, p. 1183-92, 2001.

SANYAL, A.J. *et al.* Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med**, Boston, v.362, n. 18, p. 1675-85, 2010.

SCHWIMMER, J.B. Definitive diagnosis and assessment of risk for nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents. **Semin Liver Dis**, New York, v. 27, n. 3, p. 312-8, 2007.

SEEDO. Sociedad española para el estudio de la obesidad. Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapêutica. **Med Clin**, Barcelona, v. 115, p. 587-97, 2000.

SEKI, S. *et al.* In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 37, p. 56-62, 2002.

SHULDINER, A.R.; MUNIR, K.M. Genetics of obesity: more complicated than initially thought. **Lipids**, Champaign, v. 38, n. 2, p. 97-101, 2003.

SILVERMAN, E.M.; SAPALA, J.A.; APPELMAN, H.D. Regression of hepatic steatosis in morbidly obese persons after gastric bypass. **Am J Clin Pathol**, Baltimore, v. 104, p. 23-31, 1995.

SPRUSS, A. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 1094-104, 2009.

ST GEORGE, A. *et al.* Effect of alifestyle intervention in patients with abnormal liver enzymes and metabolic riskfactors. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 24, n. 3, p. 399-407, 2009.

SUZUKI, A. *et al.* Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 43, n. 6, p. 1060-6, 2005.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 18, n. 19, p. 2300-8, 2012.

TINIAKOS, D.G.; VOS, M.B.; BRUNT, E.M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. **Annu Rev Pathol**, v. 5, p. 145-71, 2010.

TSUKAMOTO, H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 4, p. 741-8, 2002.

UENO, T. *et al.* Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. **J Hepatol**, Copenhagen, v. 27, p. 103-7, 1997.

UYGUN, A. *et al.* Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 537-44, 2004.

VAN ITALLIE, T.B.; YANG, M.U. Cardiac dysfunction in obese dieters: a potentially lethal complication of rapid, massive weight loss. **Am J Clin Nutr**, v. 39, n. 5, p. 695-702, May. 1984.

VIDELA, L.A. *et al.* Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 37, p. 1499-507, 2004.

WANG, Y. *et al.* Biochemical characteristics and risk factors in non-alcoholic fatty liver. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 1, n. 2, p. 105-10, Jan. 2010.

WANLESS, I.R.; LENTZ, J.S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, Baltimore, v. 12, p. 1106-10, 1990.

WESTWATER, J.O.; FAINER, D. Liver impairment in the obese. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 34, n. 4, p. 686-93, 1958.

WIECKOWSKA, A.; FELDSTEIN, A.E. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease:invasive versus noninvasive. **Semin Liver Dis**, New York, v. 28, n. 4, p. 386-95, 2008.

YAMAMOTO, M. *et al.* Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, Melbourne, v. 22, n. 4, p. 498-503, 2007.

YIN, M. *et al.* Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. **Clin Gastroenterol Hepatol**, Philadelphia, v. 5, n. 10, p. 1207-13, 2007.

YOUNOSSI, Z.M. Nonalcoholic fatty liver disease. **Curr Gastroenterol Rep**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 57-62, 1999.

YOUNOSSI, Z.M. Review article: current management of non-alcoholic fatty liverdisease and non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 2-12, 2008.

ZELBER-SAGI, S. *et al.* Role of leisure-time physical activity innonalcoholic fatty liver disease: a population-based study. **Hepatology**, Baltimore, v. 48, n. 6, p. 1791-8, 2008.

ZHU, F.S. *et al.* Effects of n-3 polyunsaturatedfatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 14, n. 41, p. 6395-400, 2008.

4 RESULTADOS E ANÁLISE DOS DADOS

4.1 Artigo 1 - *Sucrose-rich diet induced obesity model: emphasis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*

Sucrose-rich diet induced obesity model: emphasis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease

Maria Luiza Rodrigues Pereira Lima^{1,2}; Laura Hora Rios Leite³; Carolina Rosa Gioda⁴; Fabíola de Oliveira Paes Leme⁵; Claudia Alves Couto^{1,6}; Cândido Celso Coimbra⁷; Virginia Hora Rios Leite², Teresa Cristina Abreu Ferrari^{1,6}

¹Alfa Institute of Gastroenterology, Clinic Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Department of Physiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

⁴Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵Department of Clinic Veterinary and Surgery, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁶Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁷Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Running title: Obesity-related pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease

Correponding author:

Dr. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica.

Av. Professor Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: tferrari@medicina.ufmg.br,

Phone: + 55 31 34099746, Fax: + 55 31 34099664

ABSTRACT

Aims: Obesity has become epidemic worldwide and is a major risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We investigated the effects of a simple carbohydrate rich-diet on the development of obesity-related NAFLD, and the impact of physical training on the metabolic alterations associated with this disorder.

Methods: 60 male Wistar rats were randomly separated into control (CG), and experimental (EG) groups, which were fed with standard rat diet and diet enriched with simple carbohydrate, respectively. The diets were offered for 5, 10, 20 and 30 weeks. At the end of each experimental period, the animals were sacrificed and blood was collected for glucose, lipid profile, leptin and insulin analyses; liver samples were obtained for histology, evaluation of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, and determination of leptin, leptin receptor (Ob-R) and malondialdehyde (MDA) expression. Another group of animals underwent physical training prior to sacrifice.

Results: Glucose, triglycerides and cholesterol-VLDL levels were significantly higher in EG, at week 30. The levels of insulin and leptin were significantly higher in EG rats at all times. A positive correlation between increase in BMI and serum leptin was observed. SOD and CAT activities were depressed in EG rats, at week 30. Steatosis and hepatocellular ballooning was only evident in EG animals as well as MDA reaction. Ob-R was identified in both groups, while leptin was more highly expressed in EG. Physical trained rats presented significantly higher HDL-cholesterol levels.

Conclusions: A simple carbohydrate rich-diet produced obesity with potential development of NAFLD.

Key words: non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome, antioxidant enzymes, oxidative stress, exercise.

Introduction

Over the last decades, obesity has become a global epidemic and an important public health problem in many countries. This condition is attributed, at least partially, to excessive consumption of saturated fats and simple sugars [1,2], which associated with sedentarism represent the modern lifestyle [3]. Obesity is recognized as a risk factor for many disorders [5], including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). It is estimated that 70% of obese and diabetic patients have hepatic steatosis, whose prevalence in the general population is 15-25% [5]. In addition to be associated with the development of NAFLD [5,6], evidence suggests that obesity may accelerate its progression [4]. NAFLD encompasses a spectrum of increasingly severe clinico-pathological conditions ranging from steatosis to steatohepatitis (NASH) with or without hepatic fibrosis/cirrhosis. Furthermore, recent studies demonstrate that NAFLD is also related to increased risk of hepatocellular carcinoma [7-9]. Thus, given the worldwide epidemic of obesity, NAFLD is one of the great challenges of the next decade [4].

NAFLD has been considered the hepatic component of the metabolic syndrome (MS), which is characterized primarily by obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance, type 2 diabetes, hypertriglyceridemia and hypertension [9]. It is believed that insulin resistance and high circulating levels of insulin play a key role in the pathogenesis of NALFD (first causative step). Excessive accumulation of fat in adipocytes and muscles determines insulin resistance and also predisposes to the deposition of fat in the liver [9]. This high influx of fatty acids into the liver causes an increase in the rate of mitochondrial beta-oxidation of fatty acids and ketogenesis [10], which can promote lipid peroxidation and accumulation of

malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal in the hepatocytes [11]. These compounds generate a variety of cellular stimulation and subsequent inflammatory response. Oxidative stress, proinflammatory cytokines, hyperinsulinemia, hypoadiponectinemia, hyperleptinemia, and apoptosis are recognized as the causal factors of NASH/fibrosis (second causative step) [12,13].

In spite of the growing knowledge about NAFLD, several aspects of its pathogenesis are still unknown and warrant investigation. Considering the difficulty in developing human studies to evaluate the influence of nutrition in the development of NAFLD, experimental models constitute a reliable alternative pathway. In this study, we investigated the effects of a simple carbohydrates-rich diet on the induction of obesity in Wistar rats, aiming at contributing to the understanding of obesity-mediated development of NAFLD. Furthermore, we evaluated the impact of physical training on the metabolic alterations associated with this disorder.

Material and Methods

Animals and Experimental Design

Sixty male Wistar rats, approximately 28 days old (after weaning), were housed individually at a room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, under 10-14 hours light-dark cycles and had free access to water and rat diet. The animals were randomly separated into the following groups: control group (CG), which consisted of 30 rats fed with standard rat chow during 5 (CG5, 6 rats), 10 (CG10, 6 rats), 20 (CG20, 6 rats) and 30 (CG30, 12 rats) weeks; and experimental group (EG) which included 30 rats

fed with highly palatable diet (see below) during 5 (EG5, 6 rats), 10 (EG10, 6 rats), 20 (EG20, 6 rats) and 30 (EG30, 12 rats) weeks. From week 25 to week 30, 12 animals belonging to the CG30 (6 rats) and EG30 (6 rats) were submitted to physical training (see below).

At the end of each experimental period, after fasting for 10 hours, the animals were sacrificed with a lethal dose of sodium phenobarbital (90 mg/kg body weight, i.p.). Blood samples (1 ml) were taken by cardiac puncture and stored at -20°C. The livers were immediately removed and weighed. Fragments of about 1 mm thickness were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated in solutions of increasing concentration of ethanol, immersed in xylene, and then embedded in paraffin.

All experiments were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais for the Care and Use of Laboratory Animals, and were carried out in accordance with the regulations described in the Committee's Guiding Principles Manual. A rat belonging to the CG20 died and was excluded from all analyses.

Diet

The animals of the CG were fed with standard rat chow (Nuvilab-CR1 Nuvital-Colombo, Brazil) with the following nutrient composition: protein, 22%; fat, 4%; carbohydrate, 42%; minerals, 10%; phosphorus, 0.8%; vitamins, 1%; fiber, 8%; water, 12.5%. The chemical analysis revealed that 100 g of this diet contained: 309 kcal, 24.8 g of protein, 3.4 g of fat, 44.8 g of carbohydrates, 8.2 g of fixed mineral residue, 18.8 g of dietary fiber. The rats of the EG were fed with diet

known as effective in inducing obesity in rats, and described as highly palatable. Such diet had the following nutrient composition: 33% of standard rat chow compacted to powder, 33% of condensed milk (MOÇA, Nestlé®, Brazil), 7% of sucrose (Refined sugar, União®, Brazil) and 27% of water [14]. The condensed milk was nutritionally composed of: carbohydrate, 56.7%; fat, 8.3%; protein, 6.7%; water, 28.3%. According to the chemical analysis, 100 g of dried highly palatable diet contained: 339 kcal, 16.1 g of protein, 3.4 g of fat, 61.0 g of carbohydrates, 5.1 g of fixed mineral residue and 14.4 g of dietary fiber.

The diet was prepared daily, weighed, fractionated in portions and stored in the feeder for 8-10 hours. The remaining food in the feeder was weighed to calculate the final amount of ingested food. The water content of the drinking bottles was renewed daily.

Anthropometric Parameters

On a week basis, the body weight, the thoracic circumference (TC) (distance between the foreleg and hindleg) and the naso-anal length were measured. The body mass index (BMI), i.e. the ratio between body weight (g) and the square of body length (cm²) was calculated [15].

Physical Training

All animals were acclimatized to exercise on the motor-driven treadmill (Gaustec, Brazil) by running at a speed of 10 m·min⁻¹ at 5% inclination for 5 minutes per day during 5 consecutive days. The purpose of this preliminary exercise was to show

the animals in which direction to run. After exercise familiarization, trained rats were submitted to the physical training protocol, which consisted of running sessions with gradual increase in intensity across 5 weeks, 5 days a week. The speed and duration of the exercise bouts were increased until the rats were able to run at $25 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, 5% inclination during 60 minutes/day. The achievement of this exercise intensity ensures that a significant endurance training effect is produced. In order to ensure that all animals were subjected to the same handling stress, untrained group was submitted to running exercise on the same days of physical training, at the same speed, but for 2 minutes only [16].

Analytical Procedures of Blood Parameters

Measurement of glucose, total cholesterol, very low-density lipoprotein (VLDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and triglycerides were performed as recommended by the manufacturer (Bioclin, Quimbasa, Basic Chemistry Ltda, Brazil) using an autoanalyzer (StatPlus 2300, Yellow Spring Inst, USA).

Serum concentrations of leptin and insulin were determined by radioimmunoassay (Rat Leptin Ria Kit, Rat Insulin Ria Kit, LINCO Research, USA) using a gamma-ray counter (Mor-ABBOT, USA). The minimum detection value was 0.5 ng/ml.

Evaluation of antioxidant enzyme activity

The determination of superoxide dismutase (SOD) activity was adapted from Dieterich et al. [17]. Briefly, liver samples were homogenized in 50 mM sodium phosphate buffer (1 ml, pH 7.8, 37°C) and 1 mM of diethylenetriamine pentacetic acid (DTPA). The reaction was initiated by addition of pyrogallol acid (0.2 mM/l, 37°C for 3 minutes) and the absorbance measured at 420 nm. The SOD activity was calculated as U/mg protein, where 1U of the enzyme was defined as the amount required to inhibit the oxidation of pyrogallol by 50%.

Catalase (CAT) activity was measured in the supernatant of liver homogenate as described by Nelson and Kiesow [18]. Briefly, 0.04 ml of H₂O₂, 0.06 ml of liver homogenate and 1.9 ml of potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) were mixed to give a final concentration of 6 mM of H₂O₂. It took 1 minute for the reaction to occur at room temperature. The decomposition of H₂O₂ by CAT was evaluated by the change in absorbance at 240 nm. The experiments were performed in duplicate. CAT activity was expressed as mmol of H₂O₂ decomposed per minute per milligram of protein. This procedure was adopted to avoid the possibility of interference in the activity of glutathione peroxidase, once the necessary co-factors were not present in the reaction medium.

Histological Evaluation

Histological sections were made from material embedded in paraffin (4 mm thick), stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, Gomori ammoniacal silver, Perls, and esterase reaction for identification of neutrophils. On histological

evaluation the following characteristics were investigated: micro and macrovacuolar steatosis, hepatocellular ballooning and their location in the liver acinus. The histological analysis was performed simultaneously by 2 examiners.

Evaluation of MDA, Leptin and Leptin Receptor (Ob-R) Expressions

The hepatic expression of MDA, leptin and Ob-R was evaluated by immunohistochemistry in the animals sacrificed at the weeks 20 and 30. From paraffin embedded tissues, sections on salanized slides (4 mm) were collected, deparaffinized and hydrated. For immunohistochemistry, antigen reaction with EDTA at pH 8.0 no steamer for 30 minutes at 98°C was conducted, followed by Tris HCl pH 7.6 washing. The whole procedure was performed using Polymer Detection System kit (Novolink™ Polymer Detection System, Novocastra, USA). The primary antibodies used were: anti-MDA monoclonal antibody (1F83) (Cosmo Bio Co., Ltd, Japan) diluted in 0.5 ml; anti-Ob (A-20) sc-842, and anti-Ob-R (H-300) sc-8325 (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) at a dilution of 1:250 and 1:100, respectively.

Statistical Analysis

Data are presented as frequencies and percentages, mean \pm standard deviation (sd), and median and quartiles 1 (Q1) and 3 (Q3). Correlations were assessed using the Pearson's or Spearman's correlation coefficients, when applicable. For each quantitative response variables, we developed linear regression models in which all variables with p-value ≤ 0.25 at univariate analysis would be included

initially. However, due to the high level of correlation between the explanatory covariates, we opted to adjust the final model with the following covariates: group, physical training, variation in BMI (Δ BMI) and variation in the amount of ingested calories (Δ Kcal). The adequacy of the models was assessed by analysis of the residues. For the categorical variables, logistic regression models were developed, with inclusion of the variables that showed on the univariate analysis a p-value ≤ 0.25 , and also clinical significance. The model fit was assessed by the Hosmer-Lemeshow test.

Statistical analysis was performed using the R public domain software. Significance level was set at p-value < 0.05 .

Results

Descriptive Analysis of the Variables and Comparison between Experimental and Control Groups

The results of the anthropometric measurements, lipid and glucose profile, hormones levels and antioxidant enzymes activity, as well as the results of their comparative analyses between CG and EG along the time of follow-up are described in Tables 1, 2 and 3.

TABLE 1 – Comparison of anthropometric variables between experimental and control groups

Time Weeks	Groups				Value- p
	Experimental		Control		
	Mean (\pm dp)	Median (Q1-Q3)	Mean (\pm dp)	Median (Q1-Q3)	
ΔBMI (kg/cm²)					
5	0,25 (\pm 0.09)	0.27 (0.19-0.31)	0.36 (\pm 0.07)	0.39 (0.31-0.41)	0.032 ¹
10	0.26 (\pm 0.14)	0.31 (0.09-0.37)	0.27 (\pm 0.08)	0.30 (0.21-0.33)	0.082 ¹
20	0.48 (\pm 0.09)	0.48 (0.39-0.55)	0.40 (\pm 0.10)	0.43 (0.29-0.49)	0.193 ¹
30	0.50 (\pm 0.15)	0.51 (0.37-0.59)	0.34 (\pm 0.06)	0.35 (0.29-0.37)	0.003 ¹
ΔTC (cm)					
5	6.67 (\pm 0.45)	6.80 (6.17-6.93)	6.67 (\pm 0.80)	6.63 (6.15-7.14)	1.000 ¹
10	10.48 (\pm 1.86)	10.70 (8.50-11.93)	8.32 (\pm 2.04)	8.35 (6.15-10.25)	0.083 ¹
20	12.00 (\pm 1.27)	12.05 (10.20-13.03)	9.02 (\pm 1.03)	9.00 (8.15-9.90)	0.002 ¹
30	13.82 (\pm 2.84)	13.85 (11.05-16.67)	9.85 (\pm 1.30)	10.00 (9.00- 10.97)	0.031 ¹

SD: standard deviation; Q1: quartil 1; Q3: quartil 3; Δ BMI: body mass index variation; Δ TC: thoracic circumference variation; 1: t test.

TABLE 2 - Comparison of biochemical measurements between experimental and control groups

Time Weeks	Groups				Value- p
	Experimental		Control		
	Mean (±DP)	Median (Q1-Q3)	Mean(±DP)	Median (Q1-Q3)	
Glucose (mg/dl)					
5	272.3 (±92.5)	245.0 (207.0-334.5)	176.2 (±27.1)	169.5 (155.5-218.0)	0.035 ¹
10	434.5 (±214.5)	466.0 (198.5-702.0)	307.2(±121.9)	352.0 (160.0-420.0)	0.235 ¹
20	324.2 (±53.4)	346.5 (266.5-373.0)	279.4(±133.8)	290.0 (166.5-447.0)	0.468 ¹
30	463.1 (±101.7)	493.0 (361.8-548.0)	299.8 (±78.6)	311.5 (245.3-361.0)	<0.001 ¹
Total Cholesterol (mg/dl)					
5	83.5 (±18.0)	78.0 (69.5-104.8)	72.8 (±20.6)	71.0 (54.5-91.3)	0.363 ¹
10	64.5 (±13.1)	57.5 (56.0-76.0)	73.2 (±7.9)	72.0 (67.3-82.0)	0.194 ¹
20	108.0 (±33.3)	101.0 (83.3-145.3)	85.8 (±21.0)	91.0 (65.0-104.0)	0.231 ¹
30	104.3 (±33.6)	86.5 (77.3-142.8)	80.6 (±15.0)	78.5 (67.0-90.3)	0.099 ²
Cholesterol-HDL (mg/dl)					
5	44.4 (±21.9)	49.1 (22.9-65.3)	40.9 (±20.8)	39.2 (22.9-64.1)	0.779 ¹
10	36.6 (±17.0)	34.8 (23.0-52.8)	43.1 (±5.7)	42.3 (37.7-49.7)	0.689 ²
20	55.6 (±14.9)	49.6 (44.0-69.5)	59.8 (±4.6)	57.9 (56.8-63.7)	0.315 ²
30	72.2 (±35.6)	65.8 (51.8-75.3)	66.1 (±16.6)	64.0 (51.1-79.4)	1.000 ²
Cholesterol-VLD (mg/dl)					
5	20.5 (±6.1)	20.5 (14.3-25.9)	15.7 (±8.0)	13.7 (10.9-18.9)	0.149 ²
10	26.1 (±21.9)	17.4 (14.1-35.7)	16.8 (±3.2)	17.9 (13.5-19.2)	0.522 ²
20	17.8 (±6.5)	17.1 (11.8-24.3)	11.4 (±3.0)	11.0 (9.0-14.1)	0.083 ²
30	34.7 (±16.5)	26.3 (22.1-49.8)	13.0 (±5.5)	11.0 (9.1-17.0)	<0.001 ²

Cholesterol-LDL (mg/dl)

5	24.8 (±21.6)	15.7 (6.8-51.3)	24.8 (±12.2)	25.2 (13.1-34.0)	1.000 ¹
10	23.7 (±26.5)	14.5 (0.8-51.8)	12.7 (±6.0)	12.8 (8.3-17.2)	0.343 ¹
20	34.6 (±22.6)	35.4 (11.6-53.3)	19.5 (±16.6)	12.2 (6.2-36.4)	0.246 ¹
30	40.2 (±46.1)	28.4 (3.5-59.6)	15.0 (±10.7)	11.6 (8.5-20.3)	0.341 ²

Triglycerides

(mg/dl)

5	102.5 (±30.3)	102.5 (71.5-129.5)	78.7 (±40.0)	68.5 (54.5-94.3)	0.150 ²
10	130.5 (±109.6)	87.0 (70.5-178.3)	83.8 (±16.2)	89.5 (67.3-95.8)	0.522 ²
20	89.0 (±32.3)	85.5 (58.8-121.5)	57.2 (±14.9)	55.0 (45.0-70.5)	0.083 ²
30	173.7 (±82.3)	131.5 (110.5-248.8)	64.8 (±27.6)	55.0 (45.3-85.0)	<0.001 ₂

SD: standard deviation; Q1: quartil 1; Q3: quartil 3; 1: t test. 2: Mann-Whitney.

TABLE 3 - Comparison of hormonal and enzymatic levels between experimental and control groups

Time (weeks)	Groups				Value-p
	Experimental		Control		
	Mean (\pm dp)	Median (Q1-Q3)	Mean (\pm dp)	Median (Q1-Q3)	
Insulin (μl)					
5	7.4 (\pm 3.8)	7.6 (3.8-11.1)	1.7 (\pm 0.4)	1.6 (1.5-2.1)	0.005²
10	5.7 (\pm 2.7)	4.7 (3.4-8.2)	2.2 (\pm 0.9)	1.7 (1.6-3.1)	0.013²
20	0.9 (\pm 0.2)	0.9 (0.6-1.1)	0.3 (\pm 0.04)	0.3 (0.3-0.4)	0.008²
30	0.5 (\pm 0.3)	0.4 (0.3-0.8)	0.4 (\pm 0.4)	0.2 (0.2-0.4)	0.043²
Leptin (μl)					
5	15.1 (\pm 4.6)	14.3 (11.7-18.9)	6.6 (\pm 1.0)	6.6 (5.8-7.6)	0.001¹
10	14.7 (\pm 5.9)	13.7 (9.6-20.9)	4.3 (\pm 0.1)	4.4 (3.6-4.8)	0.005²
20	19.3 (\pm 10.6)	18.2 (10.3-25.9)	5.6 (\pm 2.6)	5.1 (3.3-8.1)	0.021¹
30	25.0 (\pm 12.1)	24.7 (13.1-37.0)	3.5 (\pm 2.4)	2.6 (1.8-5.7)	<0.001²
Superoxide dismutase (mg)					
5	1.5 (\pm 0.1)	1.5	1.6 (\pm 0.03)	1.6	0.090¹
10	1.6 (\pm 0.02)	1.5	1.6 (\pm 0.1)	1.5	1.000²
20	1.6 (\pm 0.1)	1.6	1.5 (\pm 0.1)	1.5	0.288¹
30	0.9 (\pm 0.3)	0.9	1.4 (\pm 0.1)	1.4	<0.001¹
Catalase (mg)					
5	15.8 (\pm 2.4)	16.5	15.9 (\pm 2.7)	16.2	0.948¹
10	14.3 (\pm 3.1)	14.0	15.9 (\pm 2.7)	16.7	0.411¹
20	11.8 (\pm 1.4)	11.6	15.1 (\pm 2.9)	14.2	0.037¹
30	14.6 (\pm 1.9)	15.0	16.7 (\pm 3.5)	16.5	0.111¹

Sd: standard deviation; Q1: quartile 1; Q3: quartile 3; 1: t-test. 2: Mann-Whitney test.

The profile of insulin and leptin variation was opposed over time in the EG. The insulin concentrations were gradually reduced, being this reduction more intense in the initial weeks. On the other hand, serum leptin levels increased progressively, being the most evident increase observed in EG30 (Figure 1).

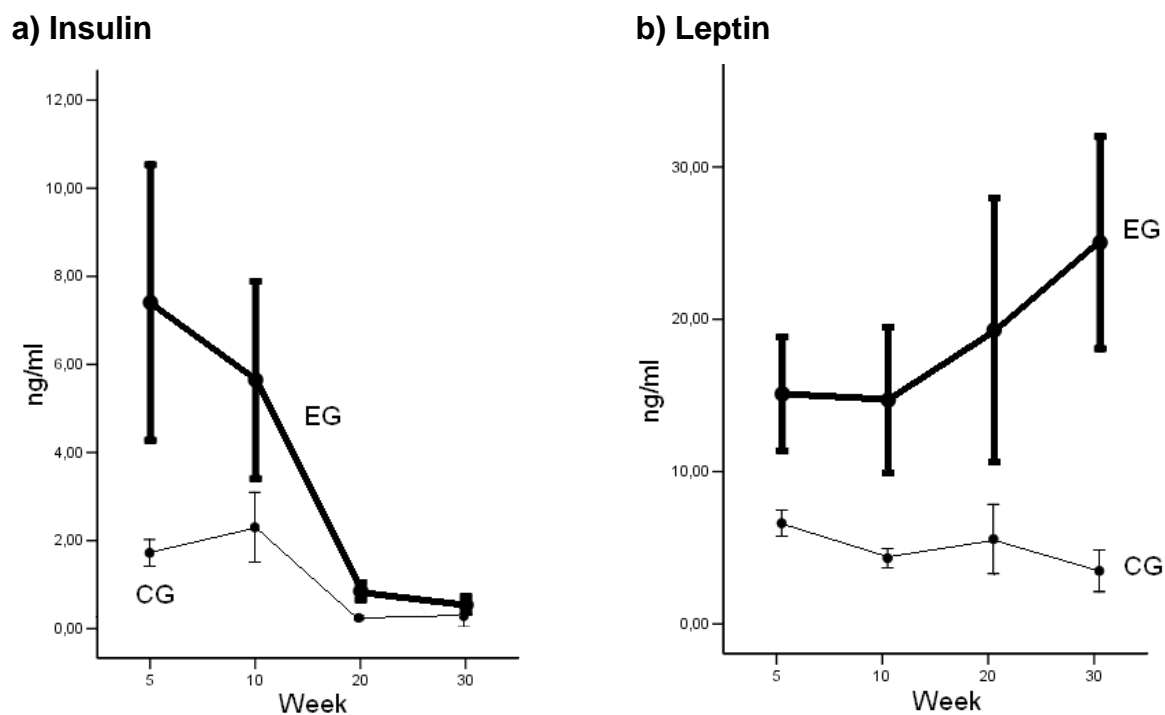
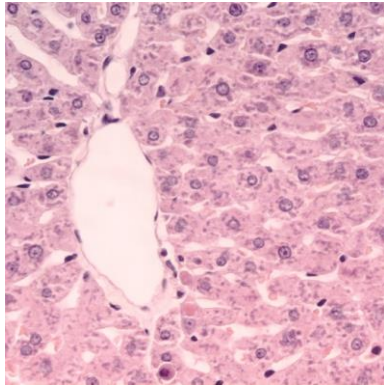
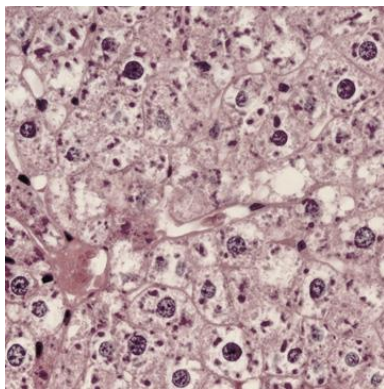


Figure 1 - Mean insulin (a) and leptin (b) by time and group

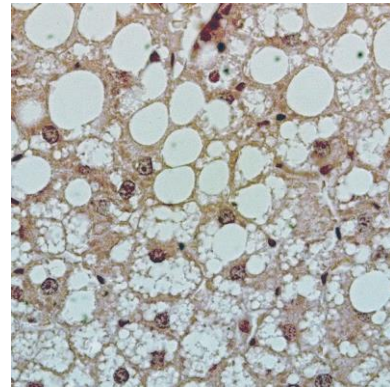
Considering all the animals included in the study, the correlation analyses demonstrated: a positive correlation between the variation in the TC (Δ TC) and Δ BMI ($r = 0.572$, $p < 0.001$); a negative correlation between insulin and glucose levels ($r = -0.256$, $p = 0.050$); a positive correlation between Δ BMI (increase) and serum leptin levels ($r = 0.412$, $p < 0.001$).



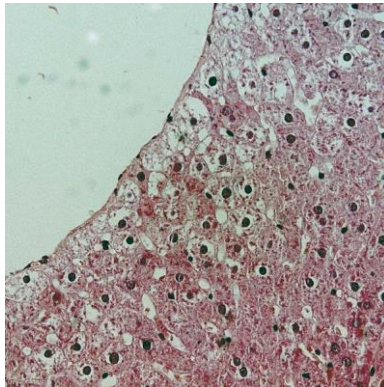
A



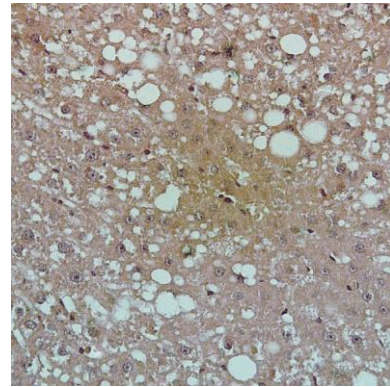
B



C



D

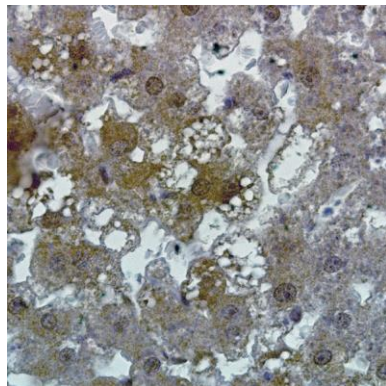


E

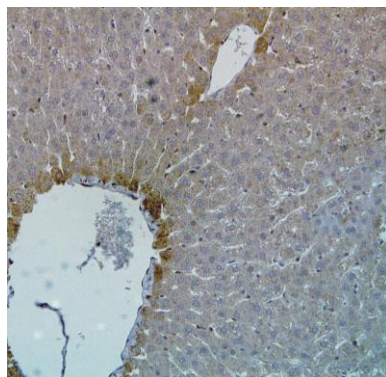
Figure 2 - Liver histology of rats. A: rats fed with standard diet (control group), hematoxylin and eosin stain x10. B, C, D, E: rats fed a sucrose-rich diet (experimental group) at 5, 10, 20 and 30 weeks respectively, hematoxylin and eosin stain x40 (B and C) and x20 (D and E); macro and micro vacuolar steatosis and ballooning distributed in zones 3 and 2 in the liver acinus.

Steatosis and hepatocellular ballooning were observed only in the EG, predominantly in EG10 and EG30. Steatosis was of macro and microvacuolar aspect, located predominantly in zone 3 of the liver acinus, with an intensity that varied from mild to severe. At weeks 10 and 30, its intensity was prominent (Figure 2). Ballooning was localized in zones 2 and 3 of the hepatic acinus, ranging from occasional to frequent and mismatched with the time of experiment (Figure 2A). From all the samples analyzed, inflammatory foci or fibrosis were not observed.

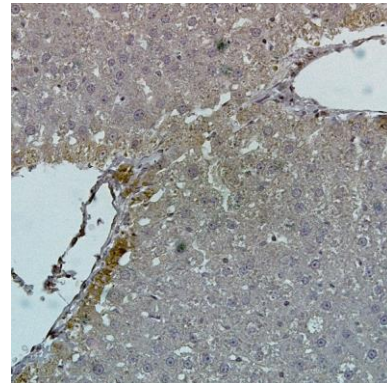
In the EG rats, the reaction for identifying MDA was positive and intense, of cytoplasmic localization in zone 3 of the hepatic lobes, around the central vein, predominantly at weeks 20 and 30 (Figure 3). No MDA was detected in CG rats.



A



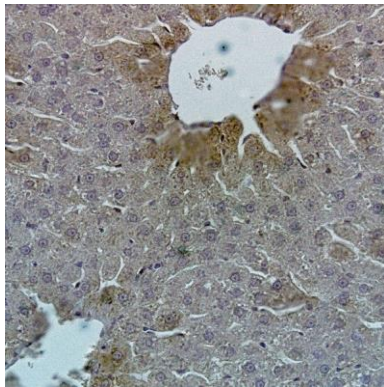
B



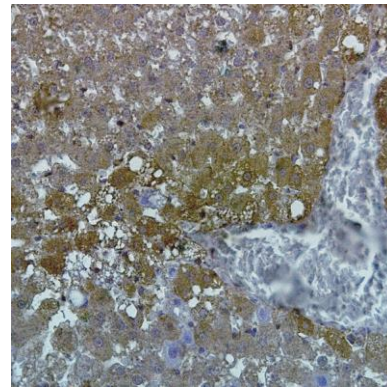
C

Figure 3 - Immunohistochemistry of rat liver. A: rats fed sucrose-rich diet (experimental group) at 30 weeks; malondialdehyde x40 B: rats fed with standard diet (control group), Obr-leptin x20. C: rat of the experimental group at 30 weeks, Obr-leptin x20.

Ob-R was expressed as a weak cytoplasmic reaction predominantly in zone 3 of the hepatic acinus in the rats of both groups, at all times of the experiment (Figure 3 B and C). The immunohistochemistry for identifying leptin was positive, cytoplasmic and intense in zone 3 of the liver acinus, and more frequent in EG20 and EG30 (Figure 4). In CG rats, the reaction was weakly positive, at the same location.



C304F OB 20x



D304F OB 20x

Figure 4 - Immunohistochemistry of rat liver. A: rats fed with standard diet (control group) at 30 weeks; leptin, x20, B: rats fed sucrose-rich diet (experimental group) at 30 weeks; leptin, x20.

The comparison of the different variables between the physical trained and untrained groups showed higher serum levels of HDL-cholesterol in the first group: medians 75 mg/dl and 52.2 mg/dl, respectively ($p = 0.007$). There were no other significant differences between the groups.

Multivariate Analysis

Table 4 summarizes the final models of linear and logistic regressions for the variables analyzed.

TABLE 4 – Linear and logistics regressions model for the response variables

Variable/Model		Coefficient (IC 95%)	Coefficient exponential (IC 95%)	Value- p
Glucose				
Constant		5.2		<0.001
Time	5			
Weeks	10	0.4	1.49 (1.1; 2.0)	0.005
	20	0.3	1.35 (1.0; 1.8)	0.090
	30	0.5	1.65 (1.3; 2.1)	<0.001
Group	EG	0.4	1.49 (1.3; 1.8)	<0.001
	CG			
Total Cholesterol				
Constant		177.7 (139.3; 216.1)		<0.001
Time	5			
Weeks	10	-25.2 (-46.8; 3.6)		0.026
	20	-50.9 (-107.7; 5.9)		0.085
	30	-40.2 (-84.8; 4.4)		0.083
Group	EG	19.2 (4.4; 31.2)		0.003
	CG			
Δ Kcal		-0.1 (-0.2; -0.03)		0.014
Cholesterol HDL				
Constant		53.1 (46.7; 59.5)		<0.001
Exercise	Yes	26.1 (12.9; 39.4)		<0.001
	No			
Δ Kcal		-0.03 (-0.05; -0.01)		0.011
Cholesterol LDL				
Constant		2.8 (-16.3; 21.9)		0.774
Δ BMI		60.2 (11.9; 108.6)		0.018
Insulin (first model)				
Constant		0.8		<0.001
Time	5			
Weeks	10	-0.005	1.00 (0.67; 1.47)	0.980
	20	-1.8	0.17 (0.11; 0.24)	<0.001
	30	-2.2	0.11 (0.07; 0.16)	<0.001
Group	EG	0.8	2.23 (0.18; 2.70)	<0.001
	CG			
Insulin (second model)				
Constant		0.7		0.011
Time (quantitative from)		-0.07	0.93 (0.91; 0.95)	<0.001
Group	EG	0.7	2.01 (1.65; 2.45)	<0.001
	CG			
Δ Kcal		0.002	1.002 (1.001; 1.003)	0.004
Leptin				
Constant		0.8		<0.001
Time	5			
Weeks	10	-0.1	0.90 (0.61; 1.33)	0.450
	20	-0.4	0.67 (0.45; 0.99)	0.047
	30	-0.5	0.60 (0.41; 0.90)	0.004

Group	EG	1.3	3.67 (3.01; 4.46)	<0.001
	CG			
Δ BMI		2.6	13.46 (5.1; 35.87)	<0.001
Dismutase superoxide				
Constant		0.7		<0.001
Time	5			
Weeks	10	-0.03	0.97 (0.85; 1.11)	0.606
	20	0.10	1.11 (0.96; 1.27)	0.156
	30	-0.27	0.76 (0.68; 0.86)	<0.001
Group	EG	-0.12	0.89 (0.82; 0.96)	0.006
	CG			
Δ IMC		-0.77	0.46 (0.32; 0.67)	<0.001
Catalase				
Constant		16.6 (15.0; 18.3)		<0.001
Time	5			
Weeks	10	-0.7 (-2.9; 1.6)		0.564
	20	-2.4 (-4.6; 0.2)		0.041
	30	-0.1 (-2.1; 1.8)		0.902
Group	EG	-1.8 (-3.2; 0.4)		0.016
	CG			

Model/Variable	Coefficient	Odds ratio (BI 95%)	Value-p
Ballooning			
Constante	-3.7		0.003
Thoracic circumference	0.4	1.50 (1.10; 1.90)	0.002
Steatosis			
Constante	-3.7		0.003
thoracic circumference	0.4	1.50 (1.10; 1.90)	0.002

EG: experimental group; CG: control group; Kcal: amount of calorie intake; BMI: body mass index variation.

The blood glucose levels were 49% higher in EG rats than in CG rats, and the rats studied for 10 and 30 weeks had an increase of 49% and 65%, respectively, in serum glucose compared to those studied for 5 weeks.

The animals studied for 10 weeks showed an average of 25.2 mg/dl lower total cholesterol as compared to those studied for 5 weeks. It was also observed that total cholesterol was 19.2 mg/dl higher in the EG in comparison with the CG. Rats undergoing physical training showed an average of 27.1 mg/dl increase in HDL-cholesterol than those who did not exercise and each increase of one unit in

Δ kcal intake caused an average reduction of 0.03 mg/dl in HDL-cholesterol levels. As for LDL-cholesterol, there was an average increase of 60.2 mg/dl for each increase of one unit in Δ BMI.

Two models were adjusted for the dependent variable insulin. The first, composed by the time (categorically) and groups of rats showed that the EG20 and EG30 had, respectively, lower insulin values of 83% and 89% compared to EG5. It was also observed that the animals of EG had an average insulin levels increased by 123% compared to the CG. The second model, including time (quantitatively form), groups of rats and Δ kcal intake, showed that for each increase of 1 unit in time, the average value of insulin decreased by 7%, and for each increase of 1 unit in Δ kcal intake, the average value of insulin increased by 0.2%. The EG rats had an average insulin level increased by 100% compared to those of the CG.

In EG20 and EG30, the leptin values were 33% and 40% higher, respectively, compared to the rats followed for 5 weeks. The EG had a mean value of leptin increased by 267% compared to the CG, and for every increase of 1 unit in Δ BMI, the average value of leptin increased by 124.6%.

The amount of SOD was 24% lower in the animals followed for 30 weeks in relation to the ones studied for 5 weeks. In the EG, the mean values of SOD were 11% lower compared to the CG. Finally, it was observed that for each increase of 1 unit in Δ BMI, the mean SOD values decreased by 54%. The rats studied for 20 weeks had an average of 2.4 less CAT units than those studied for 5 weeks, and in the EG it was observed an average of 1.8 less units of CAT relative to CG .

Concerning the histological findings, it was found that for each increase of 1 unit in the Δ TC, the chance of expressing ballooning and also steatosis increased by 50%.

Discussion

This study demonstrates that a diet with high amount of simple carbohydrates, which resembles the current dietary pattern commonly used by children, youth and adults, induces obesity with potential development of NAFLD.

Although other studies have been addressed to investigate certain characteristics of the diet and the occurrence of NAFLD/NASH [12,19-22], in none of these models the disease was completely reproduced. The model of diet enriched with fructose, described by Kawasaki et al. [22], did not even induce obesity; and, in the others, there is no description of the chronological development of the obesity-induced hepatic disease [23], nor even of the effects of dietary intake on the natural course of NAFLD development [23].

In this study, obesity/abdominal obesity was observed in the rats of the EG from the week 10, as defined by the evolution of BMI and TC. Obesity was followed by increased serum levels of glucose, triglycerides, VLDL-cholesterol and insulin: all biochemical and hormonal manifestations present in the MS [9,24]. The *de novo* hepatic lipogenesis, which is aggravated by diet with higher carbohydrate content than fat, plays an important role in glucose homeostasis and development of hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia [25,26]. For example, when the amount of ingested carbohydrate exceeds the total calorie needs, the rate of *de novo* hepatic lipogenesis increases by 10 times [27]. Similarly, this rate increases

27 times with the ingestion of diet with high carbohydrate content compared to low carbohydrate diets and fasting, and 4 times compared with the fed state [28].

In fact, high-carbohydrate diet induces insulin secretion which modulates glucose uptake by peripheral tissues including skeletal muscles. As observed in the EG during the first weeks, there was an increase in serum concentrations of insulin, which came to be 6 times higher than those recorded in the CG in week 5. At week 10, insulin levels in the EG was still 2.5 times higher than that of the CG, possibly because of resistance to its action. Thereafter, the concentrations of insulin fell to baseline levels, nullifying the difference between the groups, which is in agreement with the pathogenic mechanism of type 2 diabetes in humans [29].

A positive correlation between increase in serum levels of leptin and BMI in the EG was another finding of this study that corroborates human observations [30]. A diet rich in sucrose along with the free access to food favored the development of obesity, suggesting that the hyperleptinemia observed in this group may be not only a consequence of hyperphagia, but also a result of the fructose component of the diet, which is in agreement with the study by Vilá et al. [31], that showed induction of hyperleptinemia by fructose. In humans, increased levels of leptin have been observed in obese individuals and in patients with NAFLD/NASH [32]. It is suggested that this increase may reflect a state of leptin resistance at central level as well in the muscles and liver [32,33].

In an attempt to understand the action of leptin in the liver and its possible role in the pathogenesis of NAFLD/NAHS, we evaluated the expression of leptin and Ob-R in the hepatic parenchyma and found intense leptin reaction in EG30, whereas Ob-R was observed in both groups, without difference between them. We expected finding a more intense expression of the Ob-R in the EG. In this context,

it is important to highlight that immunohistochemistry is essentially qualitative and only allows observing large differences. A possible role of leptin as an inducer of hepatic mitochondrial beta-oxidation has been postulated, but this mechanism is poorly understood. Some authors observed that mitochondrial beta-oxidation is exacerbated in the liver of genetically modified mice (*ob/ob*) with severe steatosis [34]. Investigations employing methods for quantifying leptin and its receptors, and for differentiating leptin receptor subtypes are necessary to clarify their biological function in the normal liver and in NAFLD induced by diet.

Hepatic steatosis and hepatocellular ballooning – early stages of NAFLD – were present in all liver samples from the EG. Histological examination revealed macrovesicular steatosis, more intense the EG10 and EG30. During the early phase of the experiment, free access to the sucrose-rich diet and high food consumption caused hyperglycemia, stimulation of insulin release with consequent hyperinsulinemia. The high serum levels of insulin led to increased hepatic synthesis of fatty acids and, therefore, triglyceride accumulation in the hepatocytes, with the surplus exported as VLDL-lipoprotein. The key role of the liver in regulating carbohydrates homeostasis, being also a target organ of insulin resistance effects [25], and the fact that insulin stimulate the conversion of glucose into triglyceride in the liver via *de novo* lipogenesis [35], explain this sequence of events.

At the final stage of the investigation, although it was expected more exuberant steatosis due to the presence of obesity/abdominal obesity, and significant increases in the serum levels of triglycerides and VLDL-cholesterol, the pattern was similar to that observed at week 10. The duration of the study may not have been long enough to allow the development of more severe steatosis and/or

NASH. Moreover, genetic factors acting, for example, through hepatic compensatory mechanisms should be considered, which opens new study possibilities.

In order to detect oxidative stress, we investigated the presence of MDA as a marker of lipid peroxidation and found exuberant reaction in the EG, whereas it was negative in the CG. Oxidative stress induced by lipid peroxidation is a result of oxidant/antioxidant system imbalance [36]. Cellular stimulation by free oxygen radical species and the subsequent inflammatory response have been described as the "second hit" that culminate with the development of NASH [37,38].

In this context, we found in EG30 a significant reduction in the levels of the antioxidants enzymes SOD and CAT. This observation suggests that during the initial phases of the experiment, it seems that there was a balance between antioxidants/prooxidantes constituents; however, over time, an imbalance in favor of prooxidantes was developed. The use of diets with high levels of simple carbohydrates induces hypertriglyceridemia resulting in reduction of the antioxidants reserves, which is a risk factor for different pathological conditions [39,40], including NAFLD [41]. These findings are consistent with the concept of the beneficial effects of a diet with low caloric value and simple sugars restriction, which subsequent reduction in BMI, in promoting the balance of the antioxidant/prooxidante system [39,40].

One limitation of our study is the fact of not detecting NASH. As stated above, it is possible that the time of the experiment was not long enough to allow the development of histologic NASH, which may require higher levels of reactive oxygen species and/or longer exposure to the offending agent, in addition to liver susceptibility probably related to genetically determined factors [41,42], such as

preexisting defects in mitochondrial oxidative phosphorylation [4,41,42]. In the presence of intense and sustained production, the free oxygen radical species can cause damage to cell membranes, proteins and DNA, leading to the release of pro-inflammatory cytokines, activation of hepatic stellate cells, fibrogenesis and direct liver damage [43]. Conversely, low production of reactive oxygen species sustain biological functions and cell viability [41].

Regarding the clinical variables, increased TC was identified as an independent risk factor for the development of both steatosis and hepatocellular ballooning, which is consistent with human studies demonstrating that NAFLD is a manifestation of the MS [9,44]. Waist circumference is one of the parameters that make up the criteria of the National Cholesterol Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) for the diagnosis of MS [45]. Since this anthropometric parameter is a simple, noninvasive assessment, we reinforce its routine use in the evaluation of NAFLD as one of the clinical parameters which may predict the presence of the disease in the early stages.

Exercise is considered an effective resource for controlling metabolic changes associated with obesity [46]. The duration and the protocol of physical training used in this study were effective in increasing HDL-cholesterol. Although no impact was seen on the other variables, aerobic exercises, even for a short period of time, improved the lipid profile, regardless of the kind of diet, corroborating the findings from a study in rats Zucker [47]. On the other hand, Pinheiro et al. [48], found no significant effect on HDL-cholesterol in rats submitted to physical training. In humans, studies have shown that regular exercise reduces the risk factors for NASH [46]. Therefore, our findings strengthen the prescription of aerobic exercise in patients with NAFLD.

In conclusion, our study demonstrates that a diet enriched with simple carbohydrates induces obesity with potential development of NAFLD, here characterized by steatosis and hepatocyte ballooning; clinically, by increased TC and BMI associated with hyperleptinemia; and metabolically, by hyperglycemia followed by hyperinsulinemia (with subsequent insulin return to baseline levels), hypertriglyceridaemia, increased levels of VLDL-cholesterol, depletion of antioxidants liver enzymes, and increased levels of MDA, an oxidative stress marker.

Acknowledgements

Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

References

1. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002; **76**: 911-922.
2. Malik VS, Hu FB. Sweeteners and risk of obesity and type 2 Diabetes: The role of sugar-sweetened beverages. *Curr Diab Rep* 2012. Jan 31. [Epub ahead of print].
3. Ravussin E. Physiology. A NEAT way to control weight? *Science* 2005; **307**: 530-531.

4. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; **6**: 1-28.
5. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; **17**: S186-S190.
6. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; **121** :91-100.
7. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; **11** :1-16.
8. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 2010; **51**: 1820-1832.
9. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999; **107**: 450-455.
10. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; **120**: 1183-1192.
11. Albano E, Mottaran E, Vidali M et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; **54**: 987-993.
12. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Experim Pathol* 2006; **87**: 1-16.

13. Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med* 2008; **14**: 72-781.
14. Harrold JA, Widdowson PS, Clapham JC, Williams G. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; **279**: E340-7.
15. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007; **41**: 111-1119.
16. Priviero F, De Nucci G, Antunes E, Zanesco A. Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training. *Clin Experim Pharmacol Physiol* 2004; **31**: 741-743.
17. Dieterich S, Bieligg U, Beulich K, Hasenfuss G, Prestle J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* 2000; **101** :33-39.
18. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analyt Biochem* 1972; **49**: 474-478.
19. Lieber CS, Leo MA, Mak KM et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 502-509.
20. Armutcu F, Coskun O, Gurel A et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* 2005; **38** :540-547.
21. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009; **50**: 1094-1104.

22. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutrition* 2009; **139**: 2067-2071.
23. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; **18 (19)**: 2300-2308.
24. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; **13**: 9-19.
25. Sparks JD, Sparks CE, Adeli K. Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia. *Arteriosc Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 2104-2112.
26. Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. 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* 2003; **77**: 43-50.
27. Aarstrand A, Chinkes D, Wolfe RR. Contributions of de novo synthesis of fatty acids to total VLDL-triglyceride secretion during prolonged hyperglycemia / hyperinsulinemia in normal man. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2008-2017.
28. Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CE, Neese RA, Tremaroli JD, Hirsch J. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J Lipid Res* 2000; **41**: 595-604.
29. Zimmet P, Dowse G, Bennett P. Hyperinsulinaemia is a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab Metabol* 1991; **17**: 101-108.

30. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; **395**: 763-770.
31. Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology* 2008; **48**: 1506-1516.
32. Chitturi S, Farrell G, Frost L et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; **36**: 403-409.
33. Mantzoros CS. The role of leptin and hypothalamic neuropeptides in energy homeostasis: update on leptin in obesity. *Growth Horm IGF Res* 2001; **11**: S85-S89.
34. Brady LJ, Brady PS, Romsos DR, Hoppel CL. Elevated hepatic mitochondrial and peroxisomal oxidative capacities in fed and starved adult obese (ob/ob) mice. *Biochem J* 1985; **231**: 439-444.
35. Timlin MT, Parks EJ. Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2005; **81**: 35-42.
36. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clinical Nutr* 1995; **62**: 1315S-1321S.
37. James OF, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998; **29**: 495-501.
38. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2002; **37**: 56-62

39. Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y. Substituting honey for refined carbohydrates protects rats from hypertriglyceridemic and prooxidative effects of fructose. *J Nutrition* 2002; **132**: 3379-3382.
40. Leclercq IA. Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? *Clin Sci (Lond)* 2004; **106**: 235-237.
41. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; **192**: 1-15.
42. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastroint Liv Physiol* 2002; **282**: G193-G199.
43. Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liv* 2012; **6**: 149-171.
44. Moscatiello S, Di Luzio R, Sasdelli AS, Marchesini G. Managing the combination of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Exp Opin Pharmacoth* 2011; **12**: 2657-2672.
45. Musso G, Gambino R, Bo S et al. Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. *Diab Care* 2008; **31**: 562-568.
46. Christ CY, Hunt D, Hancock J, Garcia-Macedo R, Mandarino LJ, Ivy JL. Exercise training improves muscle insulin resistance but not insulin receptor signaling in obese Zucker rats. *J Appl Physiol* 2002; **92**: 736-744.

47. Durstine JL, Kenno KA, Shepherd RE. Serum lipoproteins of the Zucker rat in response to an endurance running program. *Med Sci Sports Exerc* 1985; **17**: 567-573.

48. Pinheiro CH, Sousa Filho WM, Oliveira Neto J et al. Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. *Arq Bras Cardiol* 2009; **93**: 392-408.

4.2 Artigo 2 - Efeitos do treinamento aeróbico sobre a peroxidação lipídica hepática em ratos *wistar* em modelo experimental de obesidade associada à NAFLD

Avaliou-se o impacto do treinamento aeróbico sobre a peroxidação lipídica hepática em modelo experimental de obesidade associada à NAFLD e os resultados demonstraram que os ratos submetidos a treinamentos aeróbicos apresentaram, em média, 1,8 mg a menos de Tbars na comparação com os ratos não treinados, independentemente da perda de peso.

O artigo está em fase de redação, para posterior submissão ao periódico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu demonstrar que dieta com elevado teor de carboidratos simples, a qual se assemelha ao padrão dietético atualmente adotado principalmente por crianças e jovens, produziu obesidade com potencial desenvolvimento de NAFLD, aqui caracterizada por: esteatose e balonização hepatocitária; clinicamente, pelo aumento da circunferência torácica e IMC, associados à hiperleptinemia; bioquimicamente, por hiperglicemia acompanhada de hiperinsulinemia, com posterior retorno da insulina aos níveis basais, hipertrigliceridemia e aumento dos níveis de colesterol-VLDL. As enzimas hepáticas antioxidantes foram depletadas e os níveis dos marcadores de estresse oxidativo, aumentados. Entretanto, o tempo de duração do experimento parece ter sido insuficiente para o desenvolvimento das formas mais graves da NAFLD.

O treinamento físico aumentou os níveis de colesterol-HDL e reduziu os níveis de peroxidação lipídica no tecido hepático.

Considerando-se que existem pontos controversos a serem esclarecidos, listam-se como perspectivas: a) qual o papel biológico do receptores Ob-R e da leptina no fígado normal e no fígado com esteatose induzido por dieta?; b) por quais mecanismos a hiperinsulinemia e a hipoinsulinemia participariam da esteatose hepática?; c) como selecionar indivíduos com suscetibilidade genética para NAFLD/NASH de forma a se beneficiar dos atuais conceitos da nutrigenética/nutrigenoma?; d) desenvolver estudos controlados priorizando estratégias de adesão dos pacientes com NAFLD/NASH quanto à modificação no estilo de vida, à prática de exercícios físicos moderados e à restrição de alguns componentes da dieta (como a sacarose), que devem ser mais bem avaliados nesses pacientes.

**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da
Universidade Federal de Minas Gerais**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 53/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Modelo experimental de obesidade em ratos: alterações histológicas e fisiopatológicas induzidas por dieta hipercalórica**", que tem como responsável **Virgínia Hora Rios Leite**, está 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 **20/ 06/2007**.

Este certificado expira-se em **20/ 06 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 53/2007**, related to the project entitled "**Experimental model the obesity in rats: changes histologic induced by hypercaloric diet**", under the supervision of **Virgínia Hora Rios Leite**, 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 20, 2007**.

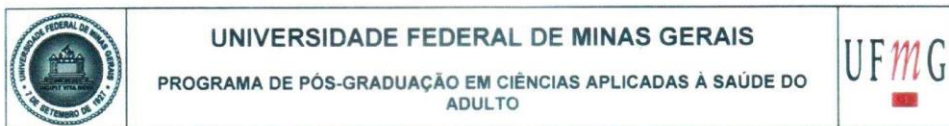
This certificate expires in **June 20, 2012**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2007.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2605
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3489-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@ppq.ufmg.br

ANEXO B – Ata da Defesa de Tese da Aluna Maria Luiza Rodrigues Pereira Lima



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MARIA LUIZA RODRIGUES PEREIRA LIMA

Realizou-se, no dia 13 de novembro de 2013, às 08:00 horas, Sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM RATOS, POR DIETA ENRIQUECIDA COM SACAROSE: ÊNFASE NA PATOGENIA DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**, apresentada por **MARIA LUIZA RODRIGUES PEREIRA LIMA**, número de registro 2009658170, graduada no curso de NUTRIÇÃO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari - Orientadora (UFMG), Prof. Eduardo Garcia Vilela (UFMG), Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal (UFMG), Profª. Adriana Aparecida Bosco (IEP-SCBH), Profª. Josefina Bressan (UFV).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2013.

Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
Doutora - UFMG

Eduardo Garcia Vilela

Prof. Eduardo Garcia Vilela
Doutor - UFMG

Paula Vieira Teixeira Vidigal

Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal
Doutora - UFMG

Adriana Aparecida Bosco

Profª. Adriana Aparecida Bosco
Doutora - USP

Josefina Bressan

Profª. Josefina Bressan
Doutora - Universidad de Navarra Pamplona Navarra

CONFERE CUM ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina - UFMG