

UNIVERSIDADE DE UBERABA
NEYDI SOBREIRA DA CRUZ SARAMAGO

Influência de uma dieta rica em gorduras e restrita em carboidratos sobre o perfil de citocinas e óxido nítrico no fígado de ratos *Wistar*

Uberaba-MG

2017

NEYDI SOBREIRA DA CRUZ SARAMAGO

Influência de uma dieta rica em gorduras e restrita em carboidratos sobre o perfil de citocinas e óxido nítrico no fígado de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada a Universidade de Uberaba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Biopatologia.

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto

Uberaba-MG
2017

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

S71i

Saramago, Neydi Sobreira da Cruz.

Influência de uma dieta rica em gorduras e restrita em carboidratos sobre o perfil de citocinas e óxido nítrico no fígado de ratos Wistar / Neydi Sobreira da Cruz Saramago. – Uberaba, 2017. 45 f.: il. ...

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia, 2017. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto.

1. Obesidade. 2. Fígado. 3. Citocinas. 4. Óxido nítrico. I. Pinto, Marcelo Rodrigues. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. III. Título.

CDD 616.398

NEYDI SOBREIRA DA CRUZ SARAMAGO

“A INFLUÊNCIA DE UMA DIETA RICA EM GORDURAS E RESTRITA EM CARBOIDRATOS SOBRE O PERFIL DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO NO FÍGADO DE RATOS WISTAR”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

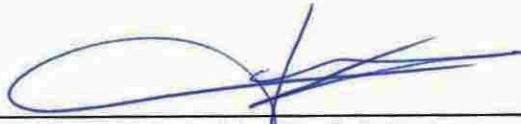
Área de concentração: Biopatologia

Aprovado (a) em: 31/03/2017

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Orientador
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Helioswilton Sales de Campos
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu querido esposo, José, pelo incentivo, paciência, amor, carinho e compreensão e por estar comigo em toda a etapa deste aprendizado, inclusive em todas as viagens à Uberaba, o que me proporcionou apoio, segurança e muita felicidade. Meu muito obrigada por participar comigo da realização de mais um sonho e conquista.

Dedico aos meus pais, Nei e Diva, pelo amor, carinho e pelo incentivo por mais esta conquista em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Rodrigues Pinto, pela orientação e os grandes ensinamentos ao longo dessa jornada.

A todos os professores do mestrado (Marcelo, Luciano, Geraldo, Cesar, Denise, Sanívia, Ruchele, João Paulo e Crisnicaw), minha eterna gratidão pelo apoio e pelos ensinamentos.

A Isabella Rodrigues Ramires pela cooperação neste estudo.

A Flávia, secretária do mestrado pela grande ajuda ao longo desse processo.

Aos colaboradores da UFTM, professor Dr. Carlo José F. de Oliveira e ao doutorando Thiago A. da Costa pela contribuição nas análises deste estudo.

Aos alunos de Iniciação Científica pela ajuda, Adriel, Sofia, Heitor, Karen e Lucas.

A minha amiga e gerente da Gestão de Informações Hospitalares do HCU da UFU, Ângela Maria F.Q. Signorelli pela cooperação durante todo o período do mestrado.

A todos que colaboraram e estiveram presentes nessa jornada, o meu muito obrigada.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCL2 ou MCP-1- Quimiocina CCL2 ou Proteína quimiotática de monócitos 1

CXCL5- Quimiocina CXCL5

CXCL8- Quimiocina CXCL8 ou Interleucina-8

DHGNA - Doença hepática gordurosa não alcoólica

DM2 - Diabetes melito tipo 2

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

HFLC- High fat low carb

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-17- Interleucina 17

IL-18- Interleucina 18

IL-23- Interleucina 23

IFN- γ - Interferon gama

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IMC - Índice de Massa Corporal

NO - Óxido nítrico

PBS - Tampão fosfato-salino

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1 - Dosagem de TNF- α no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	27
Gráfico 2 - Dosagem de IL-6 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	28
Gráfico 3 - Dosagem de IL-12p40 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	28
Gráfico 4 - Dosagem de IL-17A no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	29
Gráfico 5 - Dosagem de IL-10 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	30
Gráfico 6 - Dosagem de NO no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta AIN-93G.....	22
Tabela 2. Composição da dieta hiperlipídica (HFLC).....	23

ÍNDICE

Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Hipótese.....	19
3. Justificativa.....	20
4. Objetivos.....	21
4.1. Geral.....	21
4.2. Específicos.....	21
5. Material e Métodos.....	22
5.1. Aprovação do CEEA /UNIUBE.....	22
5.2. Manejo dos animais.....	22
5.3. Preparo da dieta HFLC.....	23
5.4. Eutanásia.....	24
5.5. Coleta do fígado e processamento das amostras.....	24
5.6. Dosagem de citocinas por ELISA.....	24
5.7. Determinação da produção de NO.....	25
5.7.1. Componentes do reagente de Griess.....	26
5.8. Análise estatística.....	26
5.9. Formatação.....	26
6. Resultados.....	27
7. Discussão.....	31
8. Conclusão.....	36
9. Referências Bibliográficas.....	37
Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIUBE.....	45

RESUMO

A obesidade é considerada uma questão de saúde pública em vários países. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), desde década de 80, o número de obesos dobrou no mundo, e no Brasil atinge um quinto da população. A obesidade está diretamente relacionada com a resposta inflamatória do tecido adiposo, que é considerado um importante “tecido endócrino” metabolicamente ativo. A questão central a ser respondida é qual a origem dos marcadores inflamatórios na obesidade. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar os níveis hepáticos de óxido nítrico e de citocinas pró e anti-inflamatórias a partir de ratos da linhagem *Wistar* submetidos a uma dieta rica em lipídeos e restrita em carboidratos (HFLC). Para isso, vinte ratos machos foram alimentados durante 11 semanas *ad libitum* com uma dieta balanceada (grupo controle, $N= 10$), ou com a dieta HFLC (grupo experimental, $N= 10$). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados, laparatomizados e o tecido hepático retirado, pesado e congelado com inibidor de protease a -70°C . As amostras foram preparadas através da lise dos tecidos seguida de centrifugação. As dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA, enquanto que o óxido nítrico foi dosado indiretamente pela detecção do nitrito pela reação de Griess. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Graph Pad Prism 7*, onde valores de $p<0,05$ foram considerados significativamente diferentes. Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a dieta HFLC induz um aumento de IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10 e de óxido nítrico no fígado, enquanto que os níveis de IL-17A permanecem semelhante ao grupo controle. Nossos achados indicam que a dieta HFLC promove uma resposta inflamatória hepática em ratos *Wistar* mediante o aumento de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, e que o aumento de IL-10 mostra a resposta do sistema imune hepático à inflamação.

Palavras-chave: obesidade; fígado; citocinas; óxido nítrico.

ABSTRACT

Obesity is a public health issue in several countries. According to the World Health Organization (WHO), since the 1980s, the number of obese has doubled in the world, and in Brazil it reaches fifth of the population. Obesity is directly related to an inflammatory response of adipose tissue, which is considered to be important metabolically active "endocrine" tissue. Thus, the central question to be answered is the origin of inflammatory markers in obesity. The central question to be answered is the origin of inflammatory markers in obesity. Therefore, the objective of the present study was determine the hepatic levels of nitric oxide and pro-and anti-inflammatory cytokines from Wistar rats submitted to high fat low-carbohydrate diet (HFLC). For this, twenty male rats were fed with a HFLC diet (experimental group, $N=10$), or with a balanced diet (control group, $N=10$). After the experimental period, the animals were euthanized, laparotomized and the hepatic tissue was removed, weighed and frozen with protease inhibitor at -70°C . Samples were prepared by tissue lysis followed by centrifugation, and the assays performed by ELISA. The cytokine dosages were performed by ELISA, whereas nitric oxide was measured indirectly by the detection of nitrite by the Griess reaction Statistical analysis was performed using the Graph Pad Prism 7 program, where $p<0.05$ values were considered significantly different. The data obtained in the present study showed that the HFLC diet induces an increase of IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10 cytokines and nitric oxide in the liver, whereas IL-17A levels remain unchanged compared to the control group. Our findings indicate that the HFLC diet promotes a hepatic inflammatory response in Wistar rats by increasing proinflammatory cytokines and nitric oxide, and that the increased IL-10 shows the hepatic immune system response to inflammation.

Key-words: obesity; liver; cytokines; nitric oxide.

1. Introdução

Ao longo das últimas décadas, a rápida urbanização, o crescimento econômico, a industrialização e o transporte mecanizado influenciaram e proporcionaram grandes mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares. A crescente incorporação pela população mundial por dietas de “acesso rápido”, e que promovem um balanço energético positivo como a dieta ocidental, com altos teores de gorduras, colesterol, proteínas, açúcares e sal, bem como o consumo de alimentos processados e *fast-foods* associados à diminuição da atividade física imposta pela vida moderna e à susceptibilidade genética, levaram o que hoje é considerada como uma epidemia global conhecida como obesidade (Malik *et al.*, 2013; Manzel *et al.*, 2014; Hruby & Hu, 2015).

A obesidade, definida como um acúmulo excessivo ou anormal de gorduras no organismo decorrente de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto calórico, é uma doença multifatorial e tem sido considerada uma epidemia e um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Esta aumenta os riscos de morbidade e mortalidade em relação aos que têm peso corporal ideal e tem sido o maior desafio para os sistemas de saúde na prevenção de doenças crônicas (Nammi *et al.*, 2004; Hruby & Hu, 2015). Um dos critérios de avaliação do total de gordura corporal em adultos é o Índice de Massa Corporal (IMC), que é calculado pelo peso em quilogramas dividido pela altura ao quadrado. Para adultos maiores de 18 anos, sobrepeso é definido como $IMC \geq 25$ e < 30 kg/m² e obesidade como o $IMC \geq 30$ kg/m² (WHO, 2000). Outra medida bastante utilizada é a medida da circunferência abdominal, que quando ≥ 88 cm em mulheres e ≥ 102 cm em homens é também considerada um preditor de risco para complicações metabólicas (Alberti *et al.*, 2009).

A prevalência de obesidade em adultos mais que duplicou entre 1980 e 2014. Na infância, a obesidade está associada a um maior risco de morte prematura na idade adulta. Além disso, crianças obesas podem apresentar dificuldades respiratórias e um risco maior para fraturas, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares precoces, resistência à insulina e distúrbios psicológicos (WHO, 2016). Dados publicados em 2013 mostraram que nos EUA, a prevalência de obesidade foi alta, sendo 31,6% para pessoas do sexo masculino e 33,9% para o sexo feminino. Nas Américas Central e Latina a prevalência foi maior do que 20% enquanto que na África do Sul foi de 42,0% para o sexo feminino. Nos países desenvolvidos houve um aumento substancial de sobrepeso e obesidade entre crianças e adolescentes, com prevalência de 23,8% no sexo masculino e 22,6% no sexo feminino (Ng *et al.*, 2014).

35 Segundo estudo publicado na revista científica *The Lancet*, até o ano de 2014
36 aproximadamente um quinto da população brasileira foi considerada obesa, sendo que o
37 número de obesos é maior entre as mulheres, cerca de 23% (18 milhões); entre os homens o
38 índice é de 17% (11,9 milhões). Os números colocam o Brasil entre os países mais obesos do
39 mundo, sendo o segundo entre os homens e o quinto entre as mulheres ficando atrás de países
40 populosos como China, Estados Unidos, Rússia e Índia. Em 1975, o Brasil ocupava o décimo
41 e o nono lugares no ranking da obesidade para homens e mulheres, respectivamente (Di
42 Cesare *et al.*, 2016).

43 A obesidade está associada comumente a importantes alterações metabólicas, que
44 constituem a síndrome metabólica cujos componentes principais são: obesidade central
45 (aumento da circunferência abdominal), triglicerídeos elevados, diminuição de lipoproteínas de
46 alta densidade (*high density lipoproteins* - HDL), aumento da glicemia plasmática e
47 hipertensão arterial sistêmica. O diagnóstico desta síndrome é feito pela presença de três
48 componentes, sendo a obesidade central obrigatória (Alberti *et al.*, 2009). Várias doenças
49 crônicas e diversos tipos de câncer têm sido associados à obesidade (Kopelman, 2000; Nammi
50 *et al.*, 2004).

51 Entre as doenças crônicas relacionadas à obesidade, encontram-se o diabetes
52 melito tipo 2 (DM2), doenças coronarianas, hipertensão arterial, dislipidemias, complicações
53 respiratórias, osteoartrites, colelitíase e algumas doenças gastrointestinais. Dentre as doenças
54 gastrointestinais encontram-se a hérnia de hiato esofágico, a doença do refluxo
55 gastroesofágico, a doença de Crohn e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).
56 A obesidade aumenta o risco para os câncer de esôfago, tireoide, colorretal, rim, endométrio,
57 ovário, pâncreas, vesícula biliar e próstata (Kopelman, 2000; Nammi *et al.*, 2004; Feakins,
58 2016).

59 O tecido adiposo branco, que é considerado um órgão multifuncional, se encontra
60 em expansão nos obesos. Este tecido, além de armazenar energia possui uma atividade
61 endócrina por sintetizar em adipócitos, células do estroma e macrófagos, numerosas
62 substâncias bioativas conhecidas como adipocinas. Entre elas estão a leptina, a adiponectina, a
63 adpsina, a proteína ligante do retinol 4, o angiotensinogênio, a resistina, a visfatina, o inibidor
64 do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), algumas citocinas como, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10,
65 IL-17, IL-18, TGF- β e quimiocinas como, CCL2/MCP-1, CXCL5, CXCL8/IL-8. As
66 adipocinas atuam no metabolismo de lipídeos, na homeostasia da glicose, no controle da
67 pressão arterial, na homeostasia vascular, na angiogênese, no balanço energético e nas

68 inflamações e distúrbios na sua produção contribuem para a patogênese da obesidade e suas
69 consequências (Trayhurn & Wood, 2004; Ahima, 2006; Ouchi *et al.*, 2011).

70 Nos obesos, o tecido adiposo branco se encontra em estado de inflamação crônica
71 de baixo grau. Há hipertrofia dos adipócitos com liberação de quimiocinas, que induzem ao
72 acúmulo de macrófagos no local e produção de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-
73 6, IL-1 β , resistina e de óxido nítrico. Estas alterações inflamatórias levam ao desequilíbrio na
74 produção das adipocinas pelo tecido adiposo, que através de suas ações autócrina, parácrina e
75 sistêmica, promovem alterações metabólicas especialmente no fígado com resistência à
76 insulina. A resistência à insulina leva à hiperglicemia e hiperinsulinemia reativa e estas
77 estimulam o acúmulo de lipídeos no fígado levando ao desequilíbrio do metabolismo hepático
78 (Qureshi & Abrams, 2007; Kamada *et al.*, 2008).

79 O acúmulo de gorduras neutras (mono, di ou triglicerídeos) no citoplasma das
80 células que normalmente não as armazenam é chamado de esteatose. A esteatose é mais
81 comum no fígado, epitélio tubular renal e miocárdio, mas pode ocorrer também nos músculos
82 esqueléticos e pâncreas. Ela aparece sempre que algum agente interfere no metabolismo dos
83 ácidos graxos da célula e pode ser desencadeada por alterações dietéticas, hipóxia, agentes
84 tóxicos e distúrbios metabólicos de origem genética. Entre as causas mais comuns, estão o
85 etilismo e distúrbios do metabolismo lipídico associado à obesidade (Pereira, 2012). Além
86 disso, alterações na microbiota intestinal podem estimular a deposição de gorduras no fígado
87 e também estão relacionadas à obesidade, resistência à insulina e doença hepática gordurosa
88 não alcoólica (Arslan, 2014).

89 A esteatose hepática é a forma mais leve da entidade patológica conhecida como
90 doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), seguida pela esteato-hepatite, fibrose e
91 cirrose hepática, que é a forma mais avançada (Targher *et al.*, 2010; Sattar *et al.*, 2014). A sua
92 principal característica é o acúmulo de lipídeos neutros, principalmente os triacilgliceróis nos
93 hepatócitos, na ausência de significativo consumo de álcool, infecções virais e outras causas
94 específicas. O acúmulo de lipídeos nos hepatócitos resulta de um desequilíbrio entre a
95 disponibilidade de lipídeos captados via sanguínea ou da lipogênese de novo e a eliminação
96 lipídica e eventualmente, leva ao estresse oxidativo e dano hepático (Musso *et al.*, 2009).

97 Geralmente benigna, a esteatose hepática pode evoluir para casos de cirrose e
98 carcinoma hepatocelular em pacientes com esteato-hepatite comprovada histologicamente
99 (Vernon *et al.*, 2011). Os mecanismos que levam a progressão para a esteato-hepatite ainda
100 não estão bem esclarecidos, e a evolução para esteato-hepatite ocorre em 20% dos casos e
101 desta para a cirrose em 20% (Attar & Van Thiel, 2013). Segundo Farrel & Larter (2006),

102 lipotoxicidade, estresse oxidativo, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios participam
103 da transição da esteatose para a esteato-hepatite.

104 A DHGNA é considerada a causa mais comum de disfunção hepática mundial e
105 tem alta prevalência em populações com síndrome metabólica, principalmente em obesos e
106 DM2. A presença de obesidade e de resistência à insulina leva a um aumento de fluxo de
107 ácidos graxos livres e um ambiente apropriado para o desenvolvimento da DHGNA (Adams
108 *et al.*, 2009; Attar & Van Thiel, 2013). Nos Estados Unidos, estima-se que a DHGNA esteja
109 presente em um terço da sua população e a esteato-hepatite, em aproximadamente 2-5 % e a
110 sua prevalência aumenta com a idade, obesidade e varia conforme o sexo e a raça, sendo
111 maior no sexo masculino (Vernon *et al.*, 2011; Lazo *et al.*, 2013). A sua prevalência passa a
112 ser maior no sexo feminino após a menopausa, período em que a capacidade hepática de
113 oxidação de ácidos graxos pode diminuir, enquanto a lipogênese é aumentada, levando ao
114 acúmulo de lipídeos no fígado (Susuki & Abdelmalek, 2009).

115 Nas últimas décadas, a DHGNA vem sendo considerada uma doença
116 multissistêmica, podendo afetar outros órgãos e aumentar o risco para as doenças cardíacas,
117 cardiovasculares, DM2 e doenças renais crônicas. Estima-se que até o ano 2030, a DHGNA
118 será a causa mais frequente de indicação de transplante de fígado. Apesar de ser considerada
119 causa de morbidade e mortalidade devido à cirrose, insuficiência hepática e carcinoma
120 hepatocelular, a maior causa de morte entre os pacientes é devido à doenças cardiovasculares
121 (Byrne & Targher, 2015). A presença e a severidade da DHGNA estão associadas ao aumento
122 do risco para as doenças renais crônicas (Musso *et al.*, 2014). Em adultos, ela está fortemente
123 associada com a aterosclerose das artérias carótidas (Sookoian & Pirola, 2008).

124 A patogênese da DHGNA ainda não está bem esclarecida, mas duas hipóteses são
125 descritas: 1) o acúmulo de triglicerídeos no fígado sensibiliza o órgão; 2) a progressão para a
126 esteato-hepatite e fibrose depende de fatores como, a produção excessiva de citocinas,
127 disfunção mitocondrial, a peroxidação lipídica, as espécies reativas de oxigênio e disfunção
128 nos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) (Zhan & An, 2010).

129 O fígado é um órgão importante e devido a sua localização anatômica está exposto
130 a uma grande variedade de antígenos do trato gastrointestinal, incluindo antígenos
131 alimentares, patógenos e toxinas. Ele é responsável pela síntese de 80-90% das proteínas
132 inatas e apresenta grande importância na resposta imune inata. Nos sinusóides hepáticos
133 encontram-se as células da imunidade inata, incluindo as células de Kupffer, células T *natural*
134 *killer*, células *natural killer* e células dendríticas. Ácidos graxos oriundos dos alimentos, das
135 bactérias intestinais e do tecido adiposo e citocinas do tecido adiposo podem se ligar via

136 receptores *toll-like* (TLR) expressos nestas células, resultando em ativação do sistema imune
137 (Zan & An, 2010; Dixon *et al.*, 2013).

138 As células de Kupffer, macrófagos residentes no fígado, podem ter capacidades
139 funcionais distintas, dependendo dos estímulos recebidos. Pela ativação clássica estas células
140 podem exibir alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e
141 produzirem o óxido nítrico pela indução da iNOS, e pela ativação alternativa, podem exibir
142 baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias mas, alta expressão de citocinas anti-
143 inflamatórias como, IL-10 e TGF- β para promover o remodelamento e reparo tecidual. As
144 células T *natural killer* podem modular a doença hepática pela produção local de citocinas
145 Th1 e Th2 (Wolowczuk *et al.*, 2008; Zhan & An, 2010; Dixon *et al.*, 2013). As células
146 *natural killer* podem ser ativadas por citocinas locais como, IL-12, IL-15 e IL-18 e que
147 desempenham papéis críticos na manutenção da homeostase hepática destas células (Kennedy
148 *et al.*, 2000; Fehniger *et al.*, 2001).

149 A associação entre obesidade, esteatose hepática e resposta inflamatória foi
150 observada em estudo em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica e que
151 demonstrou que quanto maior o grau de esteatose, maior a produção de citocinas pró-
152 inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e MCP-1 (Sheng *et al.*, 2013). Além disso, estudos em
153 camundongos mostraram que as dietas hiperlipídicas aumentam o número das células de
154 Kupffer e a expressão de citocinas como, TNF- α e IFN- γ nestas células e também ativam as
155 células T *natural killer* (Tang *et al.*, 2013) e que a ingestão de altos teores de gorduras e
156 sacarose promovem obesidade, esteatose hepática e aumentam a produção da citocina pró-
157 inflamatória IL-12, que aumenta a apoptose das células T *natural killer* (Li *et al.*, 2005).

158 Em condições fisiológicas, a produção de citocinas nos tecidos, incluindo o
159 fígado, é ausente ou mínima. Existem evidências de que várias citocinas medeiam a
160 inflamação, apoptose e necrose das células hepáticas e induzem fibrose, mas, paradoxalmente,
161 também medeiam a regeneração do tecido hepático após lesão. Entre as citocinas, TNF- α , tem
162 emergido como o fator chave nas várias fases da doença hepática (Tilg & Diehl, 2000;
163 Braunersreuther *et al.*, 2012).

164 O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta vários efeitos biológicos,
165 incluindo metabólicos, inflamatórios, proliferativos e necróticos, com aumento da expressão
166 no fígado e tecido adiposo. É secretado por macrófagos infiltrados no tecido adiposo de
167 obesos, hepatócitos, células de Kupffer e outros tipos de células em resposta à atividade
168 inflamatória crônica (Jou *et al.*, 2008). Estudos mostram que TNF- α está associado à
169 resistência à insulina, aumento da lipólise periférica, esteatose hepática, inflamação, necrose,

170 apoptose e fibrose hepática (Hotamisligil *et al.*, 1995; Tilg & Diehl, 2000; Ruan *et al.*, 2002;
171 Stojavljevic *et al.*, 2014).

172 A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por adipócitos, hepatócitos,
173 células imunes e endoteliais. Estudo *in vitro*, demonstrou que a interação entre macrófagos e
174 adipócitos humanos leva a trogocitose e a secreção de IL-6 pelos macrófagos (Sarvari *et al.*,
175 2015). O papel de IL-6 na DHGNA não está ainda bem esclarecido, pois, ela pode atuar na
176 regeneração hepática, mas também pode induzir resistência à insulina, estimular a apoptose
177 dos hepatócitos e contribuir para o desencadeamento da esteato-hepatite (Braunersreuther *et*
178 *al.*, 2012; Stojavljevic *et al.*, 2014).

179 A família de IL-12 compreende somente citocinas heterodiméricas e incluem IL-
180 12, IL-23, IL-27 e IL-35. A família de IL-12 é composta por uma cadeia α (p19, p28 ou p35)
181 e uma cadeia β (p40 ou Ebi3). A IL-12 também conhecida como IL-12p70, é composta pelas
182 subunidades p35 e p40, enquanto IL-23 é composta pelas subunidades p40 e p19.
183 Interleucina-12 e IL-23 são predominantemente pró-inflamatórias e estimulam citocinas que
184 contribuem para o desenvolvimento das células Th1 e Th17, respectivamente. Interleucina-12
185 pode induzir a produção de IFN- γ pelas células T *natural killer* e células *natural killer* e atua
186 na diferenciação das células Th1 enquanto IL-23 atua na diferenciação das células Th17
187 (Vignali & Kuchroo, 2012). Estudo em humanos demonstrou que os níveis séricos de IL-12 e
188 TNF- α encontram-se aumentados nos indivíduos com sobrepeso e obesos (Suarez-Alvarez *et*
189 *al.*, 2013).

190 A família de IL-17 é composta por IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e
191 IL-17F. Interleucina-17A e IL-17F estão envolvidas na inflamação e defesa do hospedeiro
192 pela indução da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, quimiocinas e metaloproteinasas de matriz
193 em fibroblastos e células endoteliais. IL-17E, também denominada IL-25, atua principalmente
194 nas células Th2 induzindo a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, a produção de IgE e eosinofilia e
195 assim, contribuindo para a defesa do hospedeiro nas desordens alérgicas e parasitárias. IL-17F
196 está envolvida nos mecanismos de defesa da mucosa do hospedeiro e é um amplificador de
197 respostas imunes de Th2 (Iwakura *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013).

198 A IL-17A é a citocina pró-inflamatória mais investigada da família IL-17. Ela é
199 produzida pelas células Th17, mas também por outras células da resposta imune inata e a sua
200 produção excessiva leva à inflamação e danos teciduais. IL-17A pode propagar uma cascata
201 de eventos que levam ao recrutamento de neutrófilos, inflamação e defesa do hospedeiro,
202 sendo importante contra as infecções bacterianas e fúngicas, nas doenças autoimunes,
203 desordens metabólicas e câncer (Hammerich *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013). Nos hepatócitos

204 humanos e de camundongos, a estimulação de IL-17 induz à expressão de genes associados a
205 inflamação, incluindo quimiocinas e proteína C reativa (PCR) (Patel *et al.*, 2007).

206 A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória por regular a inflamação em
207 vários órgãos e tecidos em condições fisiológicas e patológicas. Ela inibe as células T,
208 monócitos e as funções mediadas pelos macrófagos. No fígado, ela pode ser produzida em
209 várias células incluindo hepatócitos, células estreladas, células de Kupffer, células endoteliais
210 sinusóides e linfócitos (Braunersreuther *et al.*, 2012). A sua deficiência ou aberrações na sua
211 expressão pode aumentar a resposta imunopatológica frente a infecções como também levar
212 ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Iyer & Cheng, 2012). A adiponectina estimula a
213 produção de IL-10 em macrófagos humanos e a sua produção nos adipócitos pode ser inibida
214 por fatores inflamatórios como TNF- α e IL-6, bem como pela hipóxia e estresse oxidativo
215 (Ouchi *et al.*, 2011).

216 A resistência à insulina e a doença hepática desencadeadas pela obesidade,
217 ocorrem inicialmente devido à ativação das células hepáticas de Kupffer com liberação de
218 citocinas provocando inflamação hepatocelular e diminuição de transdução de sinal à insulina
219 (Huang *et al.*, 2010; Tateya *et al.*, 2011; Morinaga *et al.*, 2015). A ativação destas células
220 produz citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, anti-inflamatória como TGF- β , além
221 de óxido nítrico através da indução da iNOS. A atividade da iNOS depende da
222 disponibilidade de arginina e é influenciada pela atividade da arginase, que catalisa a
223 conversão de L-arginina em L-ornitina e uréia (Iwakiri, 2015).

224 O óxido nítrico é gerado como um subproduto da oxidação da L-arginina em
225 citrulina pela ação de três distintas isoformas de óxido nítrico sintases: a óxido nítrico sintase
226 endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a óxido nítrico sintase neuronal
227 (nNOS). A eNOS é expressa nas células endoteliais e a iNOS é expressa frente à estímulos
228 imunológicos, tais como citocinas inflamatórias e lipossacarídeos bacterianos em vários tipos
229 de células como, hepatócitos, macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas e condrócitos.
230 O óxido nítrico participa de vários processos biológicos como, a neurotransmissão e
231 homeostasia vascular, promovendo o relaxamento do vaso, inibindo a agregação plaquetária
232 e a adesão de células inflamatórias nos endotélios vasculares (Iwakiri, 2015).

233 Níveis elevados de óxido nítrico gerado pela iNOS têm sido implicados na
234 resistência à insulina hepática e na etiologia de várias doenças hepáticas, inclusive a fibrose
235 hepática. As células de Kupffer ativadas produzem grandes quantidades de óxido nítrico, que
236 reage com as espécies reativas de oxigênio para formar as espécies reativas de nitrogênio
237 como, o altamente reativo e tóxico, peroxinitrito. Estes mediadores inflamatórios ativados

238 podem ativar as células estreladas quiescentes do fígado, que são as principais células
239 contribuintes para a fibrose hepática, pois elas podem se transformar em miofibroblastos e
240 produzir colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Iwakiri, 2015).

241 O papel paralelo do tecido adiposo e os macrófagos nele residentes com as células
242 de Kupffer no desenvolvimento da esteatose e esteato-hepatite sugere que, os macrófagos
243 residentes nestes tecidos respondem de modo semelhante ao estresse metabólico da DHGNA
244 (Dixon *et al.*, 2013). Como mencionado, a obesidade pode ser desencadeada por diferentes
245 fatores, e vários estudos são realizados ano a ano no sentido de caracterizar as alterações
246 fisiológicas desencadeadas pelos diferentes tipos de dietas. Nesse sentido, os dados obtidos no
247 presente estudo vêm contribuir para um melhor entendimento das alterações fisiopatológicas
248 no fígado decorrentes da obesidade e adquiridas mediante a ingestão de dietas ricas em
249 gorduras.

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

2. Hipótese

274

275

276

277

A dieta rica em lipídeos e restrita em carboidratos altera o perfil de citocinas e de óxido nítrico no fígado de ratos da linhagem *Wistar*.

278

279

280

281

282

283

3. Justificativa

284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297

Dietas ricas em gorduras podem levar a um quadro de DHGNA em diferentes modelos experimentais, e a progressão desta patologia parece estar ligada a produção excessiva de citocinas. Em condições fisiológicas a produção de citocinas no fígado é ausente ou mínima. Contudo, existem evidências de que várias citocinas medeiam a inflamação, a apoptose e a necrose das células hepáticas, além de induzir fibrose, mas, paradoxalmente, contribuem para a regeneração do tecido hepático após lesão. Dessa forma, estudos que investiguem o papel das citocinas no contexto de doenças como a DHGNA, podem auxiliar no melhor entendimento do papel destas biomoléculas, direcionando condutas, pois além de marcadores da inflamação, estas podem ser utilizadas como possíveis alvos terapêuticos.

4. Objetivos

298

299

300

4.1 Geral:

302

303

304

305

Analisar o perfil de citocinas e os níveis de óxido nítrico presentes no fígado de ratos machos da linhagem *Wistar* alimentados com uma dieta rica em lipídeos e restrita em carboidratos.

306

307

4.2 Específicos:

309

310

✓ Dosar as seguintes citocinas no fígado:

311

- TNF- α

312

- IL-6

313

- IL-10

314

- IL-12p40

315

- IL-17A

316

✓ Dosar os níveis de óxido nítrico no fígado.

317

318

319

320

321

322

5. Material e Métodos

323
324
325

5.1. Aprovação do CEEA/UNIUBE

327
328
329
330
331

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEEA/UNIUBE), sob o protocolo de número 036/2014 (ANEXO I).

5.2. Manejo dos Animais

333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345

Para o desenvolvimento do projeto, foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Uberlândia, 20 ratos da linhagem *Wistar* machos com peso inicial médio de 129,2 g \pm 0,28g. Durante todo o experimento os animais foram mantidos no Biotério da Universidade de Uberaba (MG, Brasil) a uma temperatura de 22°C a 26°C, com um ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro e com dieta e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos, experimental e controle (n=10/grupo), em caixas de polietileno, sendo 5 animais por caixa. Os grupos foram separados de acordo com a dieta oferecida. Para o grupo controle foi ofertada dieta padrão balanceada recomendada pelo *American Institute of Nutrition*, AIN-93G (RHOSTER[®], São Paulo, Brasil) e o grupo experimental recebeu a dieta hiperlipídica (HFLC). A dieta AIN-93G fornece 394,8 kcal a cada 100g consumidas.

Tabela 1. Composição da dieta AIN-93G

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%/Kcal
Amido	39,75	251,8	63,88
Maltodextrina	13,2		
Açúcar	10		
Caseína	20	80	20,26
Óleo soja	7	63	15,95
Fibra	5		
L-cistina	0,3		
Bitartarato de colina	0,25		
Terc-butil hidroquinona	0,0014		
Vitamina	1		
Mineral	3,5		

346 Composição obtida a partir de informações do fabricante.

347

348 5.3. Preparo da dieta HFLC

349

350 A dieta experimental foi preparada no laboratório de Biologia Celular e Molecular
 351 da Universidade de Uberaba (MG, Brasil). Os ingredientes secos foram pesados em balança
 352 de precisão (MARTE AL500C[®], São Paulo, Brasil), com capacidade máxima de 500 gramas.
 353 Após as pesagens, a banha foi colocada na batedeira industrial (LIEME BP-06[®], Gastromaq,
 354 Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) com capacidade de 5 quilos, para sua
 355 homogeneização por aproximadamente dois minutos. Os ingredientes secos foram
 356 adicionados gradativamente. Depois de misturar todos os ingredientes, a dieta permaneceu em
 357 movimento na batedeira por 5 minutos e posteriormente foi armazenada em formas plásticas
 358 descartáveis com aproximadamente 90g de dieta.

359 As dietas foram armazenadas à temperatura de -20°C, sendo descongeladas
 360 previamente por aproximadamente 15 minutos para a utilização. A dieta HFLC tem na sua
 361 composição uma base de banha de porco SADIA[®] (316011/108634-V71; 321891/108634-
 362 V71), caseína láctea (RHOSTER[®]), açúcar (UNIÃO[®]), fibra-celulose (RHOSTER[®]), L-
 363 cistina (RHOSTER[®]), bitartarato de colina (RHOSTER[®]), colesterol (VETEC[®]), mix
 364 vitamínico AIN-93G e mineral (RHOSTER[®]), fornecendo 721,9kcal a cada 100g.

365

366 **Tabela 2.** Composição da dieta hiperlipídica (HFLC)

Ingredientes	Quantidade (g)	Kcal	%/Kcal
Banha de porco	68,7	618,3	85,65
Caseína	19	76	10,53
Açúcar	6,9	27,6	3,82
Fibra	0,23		
Mix vitamínico	1,0		
Mix Mineral (AIN 93G)	3,5		
L-cistina	0,3		
Bitartarato de colina	0,25		
Colesterol	0,12		

367 Composição centesimal, porcentagem e quilocalorias da dieta hiperlipídica.

368

369

370

371

372

373

374 **5.4. Eutanásia**

375

376 Ao final da 11^a semana do experimento, os animais foram mantidos em jejum por
377 12 horas em gaiola metabólica para a eutanásia. Os animais foram eutanasiados por
378 aprofundamento da anestesia na cavidade intraperitoneal, sendo utilizado o anestésico
379 Thiopentax (tiopental sódico 50mg/Kg/peso) (CRISTÁLIA[®], São Paulo, Brasil) diluído em
380 solução salina pH 7,4. Em seguida, foi realizado a laparotomia para a coleta do fígado.

381

382 **5.5. Coleta do fígado e processamento das amostras**

383

384 O fígado foi retirado e pesado em balança digital (GEHAKA BG400[®], São Paulo,
385 Brasil) com precisão de 0,005 gramas. Foram colhidos fragmentos (0,1 a 0,9 gramas) do lobo
386 lateral esquerdo do fígado de cada animal e colocado em tubos do tipo *eppendorf* contendo
387 500µL do inibidor de protease (287mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5mM
388 KH₂PO₄; 1% v/v Nonidet P-40 [4-Nonilfenil-poli(etilenoglicol)]; 100µM TLCK
389 [Hidrocloridrato de tosil-L-lisil-clorometano, pH 7,2) (COMPLETE[®] - ROCHE,
390 Pharmaceuticals, Mannheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram armazenadas no
391 freezer a -70°C. Para as análises, as amostras foram pesadas e trituradas utilizando um
392 homogeneizador de tecidos (TISSUE-TEAROR, BioSpec Products, Inc.). Em seguida, as
393 amostras processadas foram centrifugadas a 8000xg, por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante
394 foi utilizado para a dosagem das citocinas e do óxido nítrico.

395

396 **5.6. Dosagem de citocinas por ELISA**

397

398 Os sobrenadantes obtidos foram utilizados na dosagem das citocinas IL-6, IL-10,
399 IL-12p40, IL-17A, TNF- α (Becton, Dickinson and Company) e IL-17A (R&D Systems, Inc.)
400 utilizando o ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, BD PharmingenTM, San
401 Diego, USA) tipo *sandwich* sendo este realizado de acordo com as recomendações do
402 fabricante. Os anticorpos de captura específicos foram diluídos em tampão de revestimento
403 indicado para cada citocina e distribuídos em placas de microtitulação de alta afinidade com
404 96 poços. As placas foram seladas utilizando *Parafilm*, armazenadas a 4°C *overnight* e,
405 posteriormente, lavadas com tampão PBS-Tween-20 0,05% em lavadora de placas automática
406 (BIOTEC, modelo 40ls, USA). As placas lavadas foram batidas em papel absorvente para

407 retirar resíduos da lavagem e bloqueadas com PBS-FBS 10% por 1 hora em temperatura
408 ambiente, e as amostras de sobrenadante ou proteínas recombinantes murinas foram
409 adicionadas.

410 Para a dosagem de todas as citocinas as amostras utilizadas foram diluídas na
411 proporção 1:2 em PBS-FBS 10%. As curvas padrão feitas com as proteínas recombinantes
412 murinas foram iniciadas na concentração de 2000pg/ml. As amostras adicionadas foram
413 incubadas por 2 horas, a temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas, batidas no
414 papel absorvente e anticorpos de detecção conjugado com a enzima peroxidase e diluídos em
415 PBS-FBS10% foram adicionados por 1 hora na temperatura ambiente. As placas incubadas
416 com anticorpos de detecção foram lavadas, batidas no papel absorvente e adicionadas
417 substrato TMB (Tetrametilbenzidina), sendo a reação parada com ácido fosfórico 1M. As
418 placas foram lidas em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450nm com
419 correção de 570nm. O programa *StatView 4.0* foi utilizado para transformar a absorbância
420 obtida de cada amostra no espectrofotômetro em concentração através de regressão linear,
421 obtendo assim a dosagens das citocinas. Além disso, as dosagens foram corrigidas de acordo
422 com a diluição realizada nas amostras e pelo peso do órgão processado.

423

424

425 **5.7. Determinação da produção de NO**

426 Os níveis de óxido nítrico (NO) foram obtidos através da quantificação de nitrito
427 nas amostras de fígado como parâmetro indireto da produção de NO. Para isso, utilizou-se a
428 reação de Griess (Green *et al.*, 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de
429 sulfanilamida (Reagen) e 0.1% de naftiletlenodiamino-bicloridrato (Vetec) em ácido
430 ortofosfórico (H_3PO_4) a 5% (Vetec). Neste método, o nitrito (NO_2) em meio ácido reage com
431 a sulfanilamida para produzir um íon diazônico. Os nitrogênios (diazó composto) reagem com
432 o NED (cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina), formando um cromóforo de coloração
433 rósea que apresenta pico de absorbância em 540nm (Bryan; & Grisham, 2007). Assim, 50 μ L
434 de cada amostra foram distribuídas em placa de 96 poços e, em seguida, foi adicionado 50 μ L
435 da solução de revelação na diluição 1:1 das soluções A e B (solução A: 1% sulfanilamida em
436 5% H_3PO_4 e solução B: 0,1% NED). Para a quantificação de nitrito/NO, foram comparados
437 os níveis detectados em espectrofotômetro (540nm) com os obtidos em curva padrão de
438 concentrações conhecidas de nitrato de sódio ($NaNO_3$). As dosagens foram corrigidas de
439 acordo com a diluição realizada nas amostras e pelo peso do órgão processado.

440

441 **5.7.1. Componentes do Reagente de Griess**

442

443 Ácido Fosfórico 5%

444 H_3PO_4 85% P.A. (Vetec).....20mL

445 Água deionizada Milli-Q.....320mL

446

447 **Solução A** – Sulfanilamida 1% p/v

448 Sulfanilamida (Reagen).....0,5g

449 H_3PO_4 5%.....50mL

450

451 **Solução B** - Naftiletilenodiamino – bicloridrato 0,1% p/v

452 Naftiletilenodiamino - bicloridrato (Vetec).....0,05g

453 H_3PO_4 5%.....50mL

454

455 Deixar as soluções estoque A e B a 4°C. No momento do ensaio, misturar uma parte da
456 solução A e uma parte da solução B, formando o reagente de Griess.

457

458

459 **5.8. Análise estatística**

460

461 Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos ao programa *Graph Pad*
462 *Prism 7* para verificar se apresentavam diferenças significativas. Todos os dados foram
463 submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados foram representados
464 nos gráficos como barras demonstrando a média \pm o erro padrão. Para os dados que
465 demonstraram uma distribuição não-Gaussiana, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os
466 resultados que obtiveram o valor de p menor que 0,05 foram considerados significativamente
467 diferentes, e foram indicados por um asterisco sobre a barra do gráfico.

468

469 **5.9. Formatação**

470

471 O trabalho seguiu as normas da ABNT (versão 2016), assim como as normas de
472 formatação estabelecidas pelo curso de mestrado acadêmico em odontologia da Universidade
de Uberaba.

473

474

475

476

6. Resultados

477

478

6.1. Dosagem de TNF- α no fígado

479

480

481

482

483

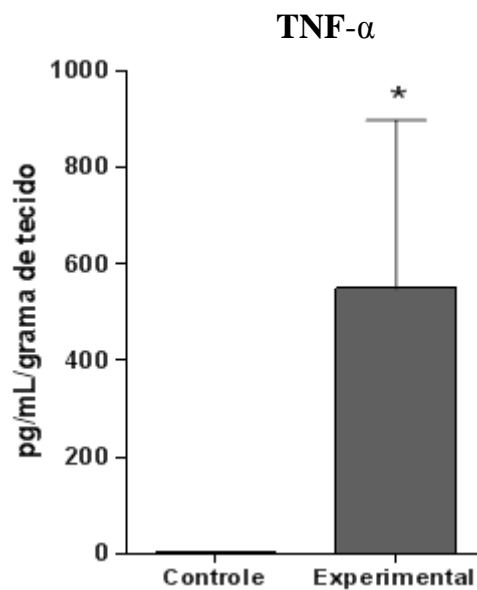
484

485

486

487

488



489

490

491

492

493

494

495

6.2. Dosagem de IL-6 no fígado

496

497

498

499

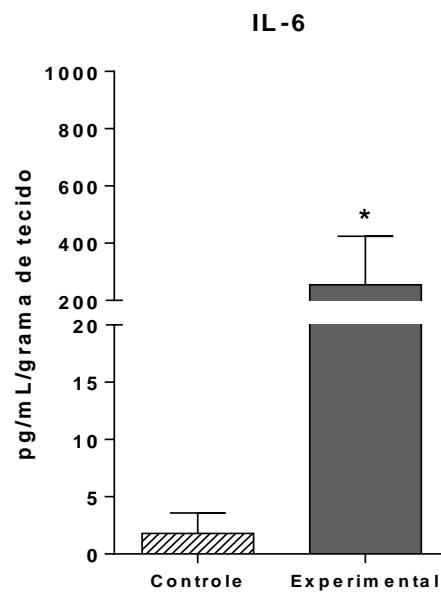
500

501

As análises do tecido hepático demonstraram que os animais submetidos à dieta HFLC apresentaram níveis aumentados de TNF- α quando comparados aos animais alimentados com a dieta balanceada ($p=0,0186$) (gráfico 1).

Gráfico 1. Dosagem de TNF- α no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados mostram um aumento dos níveis de TNF- α no grupo experimental comparado ao grupo controle. * Valor de $p < 0,05$.

As dosagens de IL-6 obtidas para os animais de ambos os grupos estão mostradas no gráfico 2. Os dados demonstraram um aumento nos níveis hepáticos de IL-6 em ratos alimentados com a dieta HFLC quando comparados aos ratos alimentados com a dieta balanceada ($p=0,0186$).



502 **Gráfico 2.** Dosagem de IL-6 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados mostram
 503 aumento dos níveis de IL-6 no grupo experimental comparado ao grupo controle. * Valor de $p < 0,05$.
 504

505

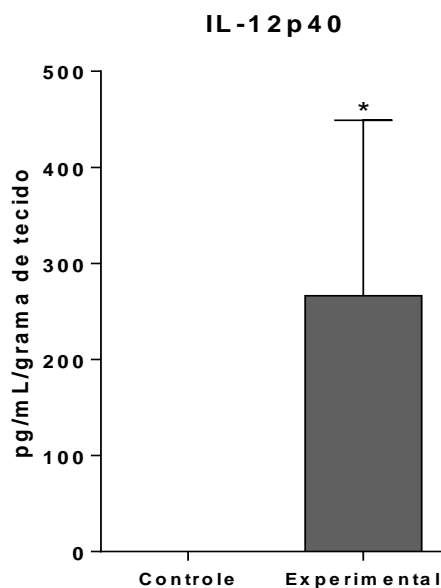
506

507

508 6.3. Dosagem de IL-12p40 no fígado

509

510 Os dados obtidos para IL-12p40 demonstraram diferenças entre os grupos
 511 avaliados ($p=0,0325$). Os níveis de IL-12p40 foram maiores no fígado dos animais
 512 alimentados com a dieta HFLC, quando comparados aos animais alimentados com a dieta
 513 balanceada (gráfico 3).



514

515 **Gráfico 3.** Dosagem de IL-12p40 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados
 516 mostram aumento dos níveis de IL-12p40 no grupo experimental comparado ao controle. * Valor de
 517 $p < 0,05$.
 518

519

520 6.4. Dosagem de IL-17A no fígado

521

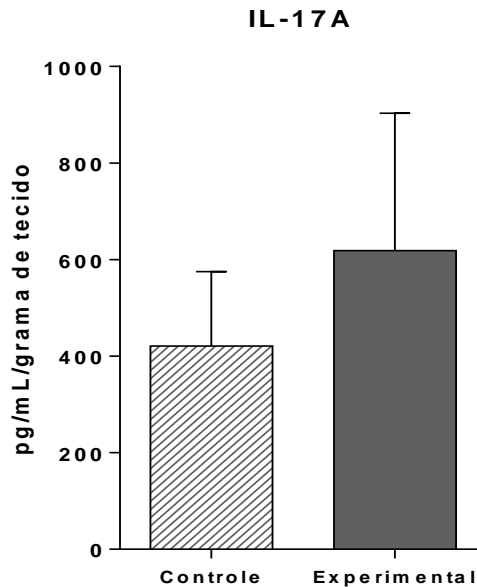
522

523

524

525

O gráfico 4 mostra os dados obtidos para IL-17A hepática. As análises demonstraram que animais do grupo experimental tendem a apresentar maiores níveis de IL-17A quando comparados aos animais do grupo controle. Contudo, tais diferenças não foram estatisticamente comprovadas ($p=0,0691$).



526

527

528

529

530

531

532

533

Gráfico 4. Dosagem de IL-17A no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados obtidos não mostram diferença nos níveis de IL-17A entre os grupos controle e experimental. Valor de $p > 0,05$.

532 6.5. Dosagem de IL-10 no fígado

533

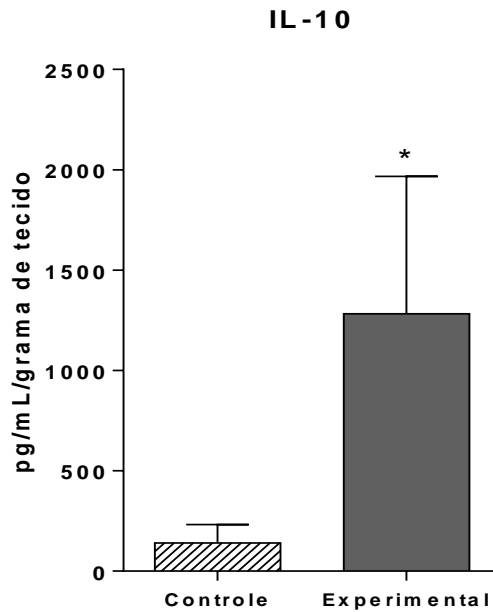
534

535

536

537

Os dados obtidos para IL-10 hepática em ratos dos grupos controle e experimental estão representados gráfico 5. As análises demonstraram que a dieta HFLC promoveu aumento nos níveis de IL-10 quando comparado ao grupo controle ($p= 0,0409$).



538
539 **Gráfico 5.** Dosagem de IL-10 no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados mostram
540 aumento dos níveis de IL-10 no grupo experimental comparado ao grupo controle. * Valor de $p < 0,05$.

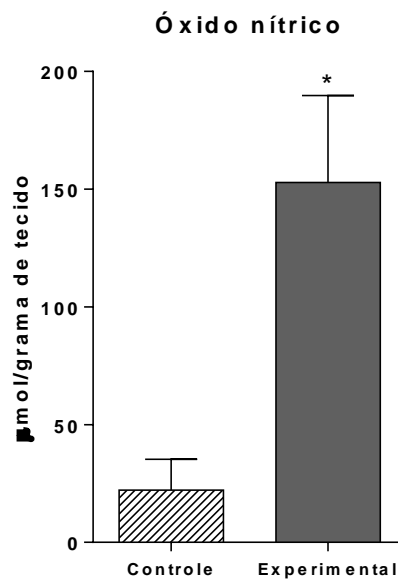
541

542

543 **6.6. Dosagem de óxido nítrico no fígado**

544

545 As dosagens de óxido nítrico demonstraram que a dieta HFLC altera o perfil desta
546 molécula no fígado dos ratos. Os dados demonstraram que animais do grupo experimental
547 possuíam aproximadamente sete vezes mais NO quando comparados ao grupo controle ($p =$
548 $0,0059$).



549

550 **Gráfico 6.** Dosagem de NO no fígado de ratos submetidos ou não a dieta HFLC. Os dados mostram
551 aumento dos níveis de NO no grupo experimental comparado ao grupo controle. * Valor de $p < 0,05$.

552

553

7. Discussão

554

555

556

557

558

559

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que uma dieta rica em lipídeos e restrita em carboidratos (HFLC) promove um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12 e TNF- α ; anti-inflamatória como IL-10; e de óxido nítrico (NO) no fígado de ratos da linhagem *Wistar*.

560

561

562

563

564

565

566

As alterações fisiológicas observadas mediante a utilização de diferentes tipos de dietas associadas a modelos experimentais vêm contribuindo para o entendimento de diversas patologias e, por vezes, tornaram-se promissoras em ações terapêuticas para doenças como esclerose múltipla, DM2, epilepsia e a própria obesidade (Brinkworth *et al.*, 2009; Ruth *et al.*, 2013; Tay *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016; Boison, 2017). Nesse sentido, a composição da dieta, o tempo de exposição, o modelo experimental utilizado e a forma de administração são fundamentais, pois alterações nestes parâmetros podem levar a diferentes observações.

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

Os componentes de uma dieta e os tipos de ácidos graxos podem levar ao desenvolvimento da DHGNA. Embora, estudos em humanos e camundongos demonstrem que o consumo de carboidratos ou de gorduras em excesso contribuem para o acúmulo de lipídeos neutros no fígado levando à esteatose e esteato-hepatite (Zivkovic *et al.*, 2007; Pierce *et al.*, 2016), recente estudo em ratos sugere que a composição da gordura é mais importante do que a quantidade de gordura consumida em termos de gorduras *cis* e *trans* (Longhi *et al.*, 2016). Segundo o estudo de Jarakamjorn *et al.* (2016) em camundongos, o acúmulo de lipídeos e a inflamação hepática dependem do tempo de consumo da dieta hiperlipídica e a progressão da esteatose para a esteato-hepatite está relacionada à ação das espécies reativas de oxigênio, que levam ao estresse oxidativo pelo desequilíbrio do sistema oxidação-antioxidação.

578

579

580

581

582

583

584

585

586

A dieta HFLC utilizada em nossos estudos possui alto teor calórico (721,9kcal/100g), onde 85,5% destas calorias têm como fonte energética a banha de porco que, por sua vez, é composta tanto de ácidos graxos saturados quanto insaturados de cadeia longa (Almeida *et al.*, 2009). Em recente estudo utilizando uma abordagem proteômica foi demonstrado que ácidos graxos de cadeia longa podem induzir apoptose, estresse oxidativo e respostas inflamatórias crônicas nas células hepáticas humanas com esteatose (Wang *et al.*, 2016). Além disso, estudo utilizando ácidos graxos saturados sugere que a expressão de COX-2 (Ciclo-oxigenase-2) e iNOS pode ser induzida pela ativação da via de expressão de NF κ B (fator nuclear kappa B) através da sinalização de TLR4 (*toll-like receptor 4*) (Lee *et al.*,

587 2001). De fato, nossos achados indicam uma resposta inflamatória hepática mediante o
588 significativo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , e de
589 óxido nítrico no fígado de ratos alimentados como a dieta HFLC. Adicionalmente, análises
590 histológicas demonstraram que 80% do fígado destes animais apresentaram grau acentuado de
591 esteatose (Ramires, 2016).

592 A associação entre esteatose hepática e resposta inflamatória foi observada em
593 estudo em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, onde o conteúdo de
594 triglicerídeos intracelulares foi diretamente proporcional à susceptibilidade dos hepatócitos a
595 apoptose e a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e
596 MCP-1 (Sheng *et al.*, 2013). Dessa forma, os dados apresentados para TNF- α e IL-6
597 associados ao grau de esteatose observado para estes animais (Ramires, 2016) indicam que
598 mecanismos semelhantes estejam ocorrendo nos ratos alimentados com a dieta HFLC. Além
599 disso, estudos realizados em camundongos indicam que as dietas ricas em lipídeos podem
600 promover um aumento dos níveis de TNF- α e IL-6 hepáticos, corroborando com nossos
601 achados (Tateya *et al.*, 2011; Morinaga *et al.*; 2015; Pan *et al.* 2015).

602 O fator de necrose tumoral alfa tem um importante papel na ativação das células
603 vizinhas da imunidade inata hepática e pode ativar variavelmente os mecanismos de
604 sinalização, que culminam em apoptose dos hepatócitos, acúmulo de células inflamatórias e
605 ativação das células estreladas, além de inibir a propagação da sinalização à insulina no
606 hepatócito, o que leva à resistência à insulina (Jou *et al.*, 2008). Evidências suportam o papel
607 de TNF- α na fisiopatologia da DHGNA: os seus níveis séricos encontram-se aumentados em
608 pacientes obesos e com esteato-hepatite; a sua expressão gênica está aumentada nos tecidos
609 adiposo e hepático de pacientes obesos; e o aumento dos níveis de TNF- α e IL-8 promove
610 estresse oxidativo e eventual apoptose com recrutamento de células inflamatórias no fígado
611 (Copaci *et al.*, 2006).

612 Nossos dados sugerem que o aumento de IL-6 ocorreu mediante indução por
613 TNF- α , através da ativação das células de Kupffer pelos ácidos graxos presentes na dieta
614 HFLC. De fato, estudo em camundongos demonstrou que TNF- α induz um aumento dos
615 níveis hepáticos de IL-6 podendo ainda levar a um quadro de resistência à insulina (Klover *et*
616 *al.*, 2003). Além disso, estudo em ratos mostrou que o aumento dos níveis séricos de TNF- α e
617 IL-6 exerce importante papel na resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica (Jiao *et*
618 *al.* 2008).

619 O papel de IL-6 na patologia hepática é complexo e sua participação no
620 desenvolvimento da DHGNA não está totalmente esclarecida. Estudos mostram que além de

621 induzir resistência à insulina, estimular a apoptose dos hepatócitos e contribuir para o
622 desencadeamento da esteato-hepatite, IL-6 pode atuar na regeneração hepática
623 (Braunersreuther *et al.* 2012; Stojavljevic *et al.*, 2014). Entretanto, a neutralização da via de
624 sinalização do receptor de IL-6 com tocilizumab, um anticorpo bloqueador específico para
625 este receptor, embora promova um aumento da esteatose hepática, melhora a lesão hepática
626 em camundongos submetidos a uma dieta que induz esteato-hepatite por insuficiência de
627 colina e metionina (Yamaguchi *et al.*, 2010).

628 Estudos demonstraram que o tratamento em camundongos obesos nocaute para
629 IL-6 com o anticorpo IL-6, melhora a resistência à insulina induzida por uma dieta
630 hiperlipídica, e que a deficiência de IL-6 nestes animais pode atenuar a esteato-hepatite
631 induzida por dieta (Klover *et al.*, 2005; Mas *et al.*, 2009). Em humanos com esteato-hepatite,
632 foi observada uma correlação positiva entre a expressão de IL-6 nos hepatócitos e a gravidade
633 da DHGNA (Wieckowska *et al.*, 2008). Assim, embora a IL-6 pudesse melhorar a lesão
634 hepática e promover regeneração, poderia também sensibilizar o fígado para lesões, estimular
635 a apoptose dos hepatócitos, induzir resistência à insulina e participar no desenvolvimento da
636 esteato-hepatite.

637 Diets com alto teor de gordura ou sacarose induzem obesidade em camundongos,
638 que, por sua vez, desenvolvem fígados gordurosos e adquirem anormalidades no sistema
639 imune inato hepático, como o aumento de apoptose nas células T *natural killer* (NKT). Esta
640 redução das células NKT leva a uma produção hepática excessiva de citocinas Th1
641 promovendo a inflamação do órgão e contribuindo para o estabelecimento da doença hepática
642 relacionada com a obesidade (Li *et al.*, 2005). Além disso, níveis aumentados de IL-12 foram
643 detectados no fígado de camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica, sugerindo que a
644 depleção de células NKT ocorre mediante aumento de IL-12 (Li *et al.*, 2005).

645 Os níveis séricos de IL-12 e IL-10 em humanos aumentam à medida que há
646 progressão da doença hepática, e o aumento dos níveis de IL-12 está relacionado à obesidade,
647 resistência à insulina, trigliceridemia e TNF- α (Suarez - Alvarez *et al.*, 2013; El-Emshaty *et*
648 *al.*, 2015). De fato, nossos dados demonstraram um aumento de IL-12p40 e IL-10 no fígado
649 dos ratos alimentados com a dieta HFLC comparado ao controle, comprovando sua relação
650 com os níveis de TNF- α e obesidade.

651 Como mencionado, os dados obtidos para IL-10 demonstraram que esta citocina
652 anti-inflamatória encontra-se em maior quantidade no fígado de ratos alimentados com a dieta
653 HFLC. Estudos demonstraram que IL-10 possui capacidade imunomodulatória e pode ser
654 capaz de inibir a lesão hepática mediada por células T e macrófagos *in vivo*, sendo útil no

655 tratamento da insuficiência hepática aguda. As possíveis atividades protetivas de IL-10
656 envolvem a modulação da proliferação dos hepatócitos e da fibrose hepática, assim como a
657 diminuição dos níveis séricos de TNF- α e IFN- γ (Nagaki *et al.*, 1999; Louis *et al.*, 2003).
658 Além disso, IL-10 tem a capacidade de inibir os monócitos e macrófagos de apresentarem
659 antígenos às células T e, portanto, IL-10 pode promover a diminuição da secreção de IL-1, IL-
660 6, IL-8, IL-12 e TNF- α (Trifunovic *et al.*, 2015). Estudo demonstrou que a dieta hiperlipídica
661 aumenta os níveis TNF- α , IFN- γ e de IL-10 no fígado de camundongos (Tang *et al.*, 2013).
662 Dessa forma, nossos dados sugerem que o aumento de IL-10 no fígado seja uma tentativa de
663 diminuir os efeitos pró-inflamatórios desencadeados por outras citocinas.

664 Estudos têm mostrado que IL-17A tem importante papel na patogênese da fibrose
665 hepática através da ativação das células estreladas no fígado, e que dietas ricas em lipídeos
666 podem induzir um aumento desta citocina no fígado de humanos e camundongos (Tang *et al.*,
667 2011; Tan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Nesse sentido, os ácidos graxos livres e IL-17
668 podem induzir a produção de IL-6 pelos hepatócitos, que associada com TGF- β , expandem as
669 células Th17 (Tang *et al.*, 2011). Além disso, o aumento dos níveis séricos de IL-17A foi
670 relacionado com a severidade das doenças hepáticas crônicas (Yasumi *et al.*, 2007).

671 Nossos dados demonstraram que os níveis de IL-17A dosados no fígado dos ratos
672 alimentados com a dieta HFLC e com a dieta AIN-93G foram semelhantes, contrapondo os
673 dados obtidos para outros modelos experimentais (Tang *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013; Kim *et al.*
674 *et al.*, 2016). Aparentemente, o tempo de exposição às dietas HFLC e AIN-93G não foi o
675 suficiente para induzir um aumento diferenciado de IL-17A entre os grupos. O período de
676 tempo também pode ter contribuído para um aumento nos níveis de IL-17A nos animais do
677 grupo controle mediante a alimentação *ad libitum* associada à falta de atividade física;
678 contudo, estas diferenças não foram extensíveis para as demais citocinas investigadas.

679 O óxido nítrico tem importante papel na fisiologia e fisiopatologia hepática. No
680 fígado, pequenas quantidades de óxido nítrico gerados pela eNOS, expressa nas células
681 endoteliais, são importantes para a homeostasia e proteção hepática (Iwakiri, 2015). Dados
682 obtidos por grupos de pesquisa em ratos e camundongos, demonstraram que dietas
683 hiperlipídicas promovem uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico hepático
684 pela diminuição da eNOS relacionada com a disfunção endotelial e mitocondrial (Eccleston *et al.*
685 *et al.*, 2011; Gonzales-Paredes *et al.*, 2016).

686 Estudo recente em fígado de humanos mostrou que ácidos graxos de cadeia longa
687 induzem os hepatócitos esteatóticos a apoptose através da ativação de caspases e do aumento
688 de óxido nítrico levando a um aumento da expressão de TNF- α e IL-6 (Wang *et al.*, 2016).

689 Além disso, outros estudos associam a ingestão de dietas ricas em lipídeos com o aumento
690 dos níveis hepáticos de NO (Mantena *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015).

691 Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os achados supracitados,
692 pois os níveis de NO encontrados no fígado de ratos alimentados com a dieta HFLC foram
693 maiores, quando comparado aos ratos do grupo controle. Estes dados sugerem uma possível
694 ativação do sistema imune hepático, seguido pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e
695 indução da iNOS. O NO gerado pela iNOS é um importante mediador citotóxico das células
696 imunes ativadas e a sua toxicidade se faz presente em situações de estresse oxidativo e
697 deficiência do sistema antioxidante e pode levar à morte celular. Em altos níveis, o NO tem
698 efeitos pró-inflamatórios e tem sido relacionado à etiologia de várias doenças hepáticas,
699 incluindo a fibrose hepática (Tateya *et al.*, 2011; Iwakiri, 2015).

700 A redução gradual de peso através de modificações nos hábitos alimentares
701 associada à prática de exercício físico tem sido considerada uma das principais formas de
702 tratamentos para todas as formas da DHGNA (Zivkovic *et al.*, 2007). Dessa maneira, estudos
703 que investiguem o efeito de diferentes tipos de dietas sobre a fisiologia são de fundamental
704 importância para desvendar as consequências que os hábitos alimentares podem trazer ao
705 organismo.

706 Os dados apresentados no presente estudo demonstram que a dieta rica em
707 lipídeos e restrita em carboidratos (HFLC) promove uma resposta inflamatória hepática em
708 ratos da linhagem *Wistar* mediante o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α ,
709 IL-12, e de óxido nítrico, e que o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 pode indicar
710 uma resposta do sistema imune hepático à inflamação. Dessa forma, o presente estudo vem
711 contribuir para o melhor entendimento dos efeitos desencadeados por uma dieta HFLC no
712 fígado de murinos associados com a obesidade e a DHGNA.

713

714

715

716

8. Conclusão

717

718

719

720

721 ✓ A dieta HFLC promoveu uma resposta inflamatória mediante o aumento dos níveis das
722 citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-12p40 e de óxido nítrico no fígado de ratos
723 *Wistar*.

724

725 ✓ A dieta HFLC não promoveu alterações significativas nos níveis de IL-17A dosadas no
726 fígado de ratos *Wistar* de ambos os grupos.

727

728 ✓ A dieta HFLC promoveu uma resposta anti-inflamatória na tentativa de diminuir os
729 efeitos produzidos pelas citocinas TNF- α , IL-6 e IL-12p40, através do aumento dos níveis
730 de IL-10 no fígado destes animais.

731

732

733

734

735

736

9. Referências Bibliográficas

737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786

1. ADAMS, L. A.; WATERS, O. R.; KNUIMAN, M. W.; et al. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. **Am J Gastroenterol**, v. 104, n. 4, p. 861-7, Apr 2009.
2. AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14 Suppl 5, p. 242S-249S, Aug 2006.
3. ALBERTI, K. G.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, Oct 20 2009.
4. ALMEIDA, M.E.F.D., QUEIROZ, J.H.D., QUEIROZ, M.E.L.R.D.; et al. Perfil lipídico tecidual de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas. **Revista de Nutrição**, v. 22, n.1, p.51-60, 2009
5. ARSLAN, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 44, p. 16452-63, Nov 28 2014.
6. ATTAR, B. M.; VAN THIEL, D. H. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. **ScientificWorld Journal**, v. 2013, p. 481893, 2013.
7. BOISON, D. New insights into the mechanisms of the ketogenic diet. **Curr Opin Neurol**, v. 30, n. 2, p. 187-192, Apr 2017.
8. BRINKWORTH, G. D.; NOAKES, M.; BUCKLEY, J. D.; et al. Long-term effects of a very-low-carbohydrate weight loss diet compared with an isocaloric low-fat diet after 12 mo. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 1, p. 23-32, Jul 2009.
9. BRAUNERSREUTHER, V.; VIVIANI, G. L.; MACH, F.; et al. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 8, p. 727-35, Feb 2012.
10. BRYAN, N.S.; GRISHAM, M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Rad Biol Med**, p. 645-647, 2007.
11. BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **J Hepatol**, v. 62, n. 1 Suppl, p. S47-64, Apr 2015.
12. CHOI, I. Y.; PICCIO, L.; CHILDRESS, P.; et al. A diet mimicking fasting promotes regeneration and reduces autoimmunity and multiple sclerosis symptoms. **Cell Rep**, v. 15, n. 10, p. 2136-46, Jun 07 2016.

787

788 13. COPACI, I.; MICU, L.; VOICULESCU, M. The role of cytokines in non-alcoholic
789 steatohepatitis. A review. **J Gastrointestin Liver Dis**, v. 15, n. 4, p. 363-73, Dec 2006.

790

791 14. DI CESARE, M.; BENTHAM, J.; SEVENS, G.A; et al. Trends in adult body-mass index
792 in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based
793 measurements studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n.10026, p.1377-96,
794 Ap 02 2016.

795

796 15. DIXON, L. J.; BARNES, M.; TANG, H.; et al. Kupffer cells in the liver. **Compr Physiol**,
797 v. 3, n. 2, p. 785-97, Apr 2013.

798

799 16. ECCLESTON, H. B.; ANDRINGA, K. K.; BETANCOURT, A. M.; et al. Chronic
800 exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability,
801 and modifies the mitochondrial proteome in mice. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 2, p.
802 447-59, Jul 15 2011.

803

804 17. EL-EMSHATY, H. M.; NASIF, W. A.; MOHAMED, I. E. Serum Cytokine of IL-10 and
805 IL-12 in Chronic Liver Disease: The Immune and Inflammatory Response. **Dis Markers**,
806 v. 2015, p. 707254, 2015.

807

808

809 18. FARRELL, G. C.; LARTER, C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to
810 cirrhosis. **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S99-S112, Feb 2006.

811

812 19. FEAKINS, R. M. Obesity and metabolic syndrome: pathological effects on the
813 gastrointestinal tract. **Histopathology**, v. 68, n. 5, p. 630-40, Apr 2016.

814

815 20. FEHNIGER, T. A.; SUZUKI, K.; PONNAPPAN, A.; et al. Fatal leukemia in interleukin
816 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+
817 T cells. **J Exp Med**, v. 193, n. 2, p. 219-31, Jan 15 2001.

818

819 21. GONZALEZ-PAREDES, F. J.; HERNANDEZ MESA, G.; MORALES ARRAEZ, D.; et
820 al. Contribution of Cyclooxygenase End Products and Oxidative Stress to Intrahepatic
821 Endothelial Dysfunction in Early Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **PLoS One**, v. 11, n.
822 5, p. e0156650, 2016.

823

824 22. GREEN, L.C.; WAGNER D.A.; GLOGOWSKI K.; et al. Analysis of nitrate, nitrite and
825 [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** v. 126 p. 131–138, 1982.

826

827 23. GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64,
828 n. 2, p. 477-85, Nov 2013.

829

830 24. HAMMERICH, L.; HEYMANN, F.; TACKE, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver
831 diseases. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 345803, 2011.

832

833 25. HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; et al. Increased adipose tissue
834 expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin
835 Invest**, v. 95, n. 5, p. 2409-15, May 1995.

836

- 837 26. HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture.
838 **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673-89, Jul 2015.
839
- 840 27. HUANG, W.; METLAKUNTA, A.; DEDOUSIS, N.; et al. Depletion of liver Kupffer cells
841 prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.
842 **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 347-57, Feb 2010.
843
- 844 28. IWAKIRI, Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase.
845 **Clin Mol Hepatol**, v. 21, n. 4, p. 319-25, Dec 2015.
846
- 847 29. IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H.; SAIJO, S.; NAKAE, S. Functional specialization of
848 interleukin-17 family members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149-62, Feb 25 2011.
849
- 850 30. IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation
851 and autoimmune disease. **Crit Rev Immunol**, v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012.
852
- 853 31. JARUKAMJORN, K.; JEARAPONG, N.; PIMSON, C.; et al. A High-Fat, High-Fructose
854 Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of
855 Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 5029414, 2016.
856
- 857 32. JIAO, K.; LIU, H.; CHEN, J.; et al. Roles of plasma interleukin-6 and tumor necrosis
858 factor-alpha and FFA and TG in the development of insulin resistance induced by high-fat
859 diet. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 161-9, May 2008.
860
- 861 33. JOU, J.; CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic
862 fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 28, n. 4, p. 370-9, Nov 2008.
863
- 864 34. KAMADA, Y.; TAKEHARA, T.; HAYASHI, N. Adipocytokines and liver disease. **J**
865 **Gastroenterol**, v. 43, n. 11, p. 811-22, 2008.
866
- 867 35. KENNEDY, M. K.; GLACCUM, M.; BROWN, S. N.; et al. Reversible defects in natural
868 killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J Exp Med**, v.
869 191, n. 5, p. 771-80, Mar 06 2000.
870
- 871 36. KIM, I. H.; XU, J.; LIU, X.; et al. Aging increases the susceptibility of hepatic
872 inflammation, liver fibrosis and aging in response to high-fat diet in mice. **Age (Dordr)**, v.
873 38, n. 4, p. 291-302, Aug 2016.
874
- 875 37. KLOVER, P. J.; ZIMMERS, T. A.; KONIARIS, L. G.; et al. Chronic exposure to
876 interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2784-9,
877 Nov 2003.
878
- 879 38. KLOVER, P.J.; CLEMENTI, A.H.; MOONEY, R.A. Interleukin-6 depletion selectively
880 improves hepatic insulin actions in obesity. **Endocrinology**, v.146, p. 3417-3427, 2005.
881
- 882 39. KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr
883 06 2000.
884
885

- 886 40. KUMAR, R.; PRAKASH, S.; CHHABRA, S.; et al. Association of pro-inflammatory
887 cytokines, adipokines & oxidative stress with insulin resistance & non-alcoholic fatty liver
888 disease. **Indian J Med Res**, v. 136, n. 2, p. 229-36, Aug 2012.
889
- 890 41. LAZO, M.; HERNAEZ, R.; EBERHARDT, M. S.; et al. Prevalence of nonalcoholic fatty
891 liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination
892 Survey, 1988-1994. **Am J Epidemiol**, v. 178, n. 1, p. 38-45, Jul 01 2013.
893
- 894 42. LEE, J.Y.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; et al. Saturated fatty acids, but not insaturated fatty
895 acids, induces the expression of cyclooxygenase-2 through Toll-like receptor 4. **The**
896 **Journal of Biological Chemistry** 276. 16683-16689, 2001.
897
- 898 43. LI, Z.; SOLOSKI, M. J.; DIEHL, A. M. Dietary factors alter hepatic innate immune system
899 in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 880-5, Oct 2005.
900
- 901 44. LIU, Z.; PATIL, I. Y.; JIANG, T.; et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance
902 and impairment of synaptic plasticity. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128274, 2015.
903
- 904 45. LONGHI, R.; ALMEIDA, R. F.; MACHADO, L.; et al. Effect of a trans fatty acid-
905 enriched diet on biochemical and inflammatory parameters in Wistar rats. **Eur J Nutr**, Jan
906 11 2016.
907
- 908 46. LOUIS, H.; LE MOINE, O.; GOLDMAN, M.; et al. Modulation of liver injury by
909 interleukin-10. **Acta Gastroenterol Belg**, v. 66, n. 1, p. 7-14, Jan-Mar 2003.
910
- 911 47. MALIK, V. S.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Global obesity: trends, risk factors and policy
912 implications. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 13-27, Jan 2013.
913
- 914 48. MANTENA, S. K.; VAUGHN, D. P.; ANDRINGA, K. K.; et al. High fat diet induces
915 dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. **Biochem J**,
916 v. 417, n. 1, p. 183-93, Jan 01 2009.
917
- 918 49. MANZEL, A.; MULLER, D. N.; HAFLER, D. A.; et al. Role of "Western diet" in
919 inflammatory autoimmune diseases. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 14, n. 1, p. 404, Jan
920 2014.
921
- 922 50. MAS, E.; DANJOUX, M.; GARCIA, V.; et al. IL-6 deficiency attenuates murine diet-
923 induced non-alcoholic steatohepatitis. **PloS One** 4, e7929, 2009.
924
- 925 51. MORINAGA, H.; MAYORAL, R.; HEINRICHS DORFF, J.; et al. Characterization of
926 distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. **Diabetes**, v. 64, n. 4,
927 p. 1120-30, Apr 2015.
928
- 929 52. MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid
930 metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Prog Lipid Res**, v. 48, n. 1, p.
931 1-26, Jan 2009.
932
- 933 53. MUSSO, G.; GAMBINO, R.; TABIBIAN, J. H.; et al. Association of non-alcoholic fatty
934 liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. **PLoS**
935 **Med**, v. 11, n. 7, p. e1001680, Jul 2014.

- 936
 937 54. NAGAKI, M.; TANAKA, M.; SUGIYAMA, A.; et al. Interleukin-10 inhibits hepatic
 938 injury and tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA expression induced
 939 by staphylococcal enterotoxin B or lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. **J**
 940 **Hepatol**, v. 31, n. 5, p. 815-24, Nov 1999.
- 941
 942 55. NAMMI, S.; KOKA, S.; CHINNALA, K. M.; et al. Obesity: an overview on its current
 943 perspectives and treatment options. **Nutr J**, v. 3, p. 3, Apr 14 2004.
- 944
 945 56. NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; et al. Global, regional, and national prevalence
 946 of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis
 947 for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-81, Aug 30
 948 2014.
- 949
 950 57. OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; et al. Adipokines in inflammation and
 951 metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.
- 952
 953 58. PAN, X.; WANG, P.; LUO, J.; et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-
 954 induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. **Endocrine**, v.
 955 48, n. 3, p. 834-47, Apr 2015.
- 956
 957
 958 59. PATEL, D. N.; KING, C. A.; BAILEY, S. R.; et al. Interleukin-17 stimulates C-reactive
 959 protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-
 960 dependent NF-kappaB and C/EBPbeta activation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 37, p. 27229-38,
 961 Sep 14 2007.
- 962
 963 60. PEREIRA, Fausto Edmundo Lima. Degenerações, morte celular, lesões de interstício,
 964 cicatrização, regeneração. In: BOGLIOLO, Luigi. **Patologia**. Editado por Geraldo
 965 Brasileiro Filho. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 4. p. 77-132.
- 966
 967 61. PIERCE, A. A.; DUWAERTS, C. C.; SOON, R. K.; et al. Isocaloric manipulation of
 968 macronutrients within a high-carbohydrate/moderate-fat diet induces unique effects on
 969 hepatic lipogenesis, steatosis and liver injury. **J Nutr Biochem**, v. 29, p. 12-20, Mar 2016.
- 970
 971 62. QURESHI, K.; ABRAMS, G. A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose
 972 tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v.
 973 13, n. 26, p. 3540-53, Jul 14 2007.
- 974
 975 63. RAMIRES, I.R. **Análise bioquímica e histológica de ratos Wistar machos submetidos a**
 976 **uma dieta hiperlipídica**. 2016. 58f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Uberaba,
 977 Universidade de Uberaba (UNIUBE), 2016.
- 978
 979 64. RUTH, M. R.; PORT, A. M.; SHAH, M.; et al. Consuming a hypocaloric high fat low
 980 carbohydrate diet for 12 weeks lowers C-reactive protein, and raises serum adiponectin and
 981 high density lipoprotein-cholesterol in obese subjects. **Metabolism**, v. 62, n. 12, p. 1779-
 982 87, Dec 2013.
- 983

- 984 65. RUAN, H.; MILES, P. D.; LADD, C. M.; et al. Profiling gene transcription in vivo reveals
985 adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for
986 insulin resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3176-88, Nov 2002.
987
- 988 66. SARVARI, A. K.; DOAN-XUAN, Q. M.; BACSO, Z.; et al. Interaction of differentiated
989 human adipocytes with macrophages leads to trogocytosis and selective IL-6 secretion.
990 **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1613, Jan 22 2015.
991
- 992 67. SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMJ**, v. 349,
993 p. g4596, Jul 29 2014.
994
- 995 68. SHENG, L.; JIANG, B.; RUI, L. Intracellular lipid content is a key intrinsic determinant
996 for hepatocyte viability and metabolic and inflammatory states in mice. **Am J Physiol**
997 **Endocrinol Metab**, v. 305, n. 9, p. E1115-23, Nov 01 2013.
998
- 999 69. SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Non-alcoholic fatty liver disease is strongly associated
1000 with carotid atherosclerosis: a systematic review. **J Hepatol**, v. 49, n. 4, p. 600-7, Oct
1001 2008.
1002
- 1003 70. STOJSAVLJEVIC, S.; GOMERCIC PALCIC, M.; VIROVIC JUKIC, L.; et al.
1004 Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of
1005 nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 48, p. 18070-91, Dec 28
1006 2014.
1007
- 1008 71. SUAREZ-ALVAREZ, K.; SOLIS-LOZANO, L.; LEON-CABRERA, S.; et al. Serum IL-
1009 12 is increased in Mexican obese subjects and associated with low-grade inflammation and
1010 obesity-related parameters. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 967067, 2013.
1011
- 1012 72. SUZUKI, A.; ABDELMALEK, M. F. Nonalcoholic fatty liver disease in women.
1013 **Womens Health (Lond)**, v. 5, n. 2, p. 191-203, Mar 2009.
1014
- 1015 73. TAY, J.; LUSCOMBE-MARSH, N. D.; THOMPSON, C. H.; et al. Comparison of low-
1016 and high-carbohydrate diets for type 2 diabetes management: a randomized trial. **Am J**
1017 **Clin Nutr**, v. 102, n. 4, p. 780-90, Oct 2015.
1018
- 1019 74. TAN, Z.; QIAN, X.; JIANG, R.; et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of
1020 liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. **J Immunol**, v. 191, n. 4, p. 1835-44,
1021 Aug 15 2013.
1022
- 1023 75. TANG, T.; SUI, Y.; LIAN, M.; et al. Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids
1024 induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death. **PLoS One**, v.
1025 8, n. 12, p. e81949, 2013.
1026
- 1027 76. TANG, Y.; BIAN, Z.; ZHAO, L.; et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and
1028 inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Immunol**, v. 166, n. 2, p. 281-
1029 90, Nov 2011.
1030
- 1031 77. TARGHER, G.; DAY, C. P.; BONORA, E. Risk of cardiovascular disease in patients with
1032 nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v. 363, n. 14, p. 1341-50, Sep 30 2010.
1033

- 1034 78. TATEYA, S.; RIZZO, N. O.; HANDA, P.; et al. Endothelial NO/cGMP/VASP signaling
1035 attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat
1036 feeding. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2792-801, Nov 2011.
1037
- 1038 79. TILG, H.; DIEHL, A. M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl**
1039 **J Med**, v. 343, n. 20, p. 1467-76, Nov 16 2000.
1040
- 1041 80. TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white
1042 adipose tissue. **Br J Nutr**, v. 92, n. 3, p. 347-55, Sep 2004.
1043
- 1044 81. TRIFUNOVIC, J.; MILLER, L.; DEBELJAK, Z.; et al. Pathologic patterns of interleukin
1045 10 expression-a review. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 25, n. 1, p. 36-48, 2015.
1046
- 1047 82. VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSE, Z. M. Systematic review: the
1048 epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic
1049 steatohepatitis in adults. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 34, n. 3, p. 274-85, Aug 2011.
1050
- 1051 83. VIGNALI, D. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers.
1052 **Nat Immunol**, v. 13, n. 8, p. 722-8, Jul 19 2012.
1053
- 1054 84. WANG, B.; LI, L.; FU, J.; et al. Effects of Long-Chain and Medium-Chain Fatty Acids on
1055 Apoptosis and Oxidative Stress in Human Liver Cells with Steatosis. **J Food Sci**, v. 81, n.
1056 3, p. H794-800, Mar 2016.
1057
- 1058 85. WIECKOWSKA, A.; PAPOUCHADO, B.G., LI, Z., et al. Increased hepatic and
1059 circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. **The American**
1060 **journal of gastroenterology**, v. 103, 1372-1379, 2008.
1061
- 1062 86. WOLOWCZUK, I.; VERWAERDE, C.; VILTART, O.; et al. Feeding our immune system:
1063 impact on metabolism. **Clin Dev Immunol**, 2008, p. 639803, 2008.
1064
- 1065 87. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2016. Disponível em: <
1066 www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 22 fev. 2017.
1067
- 1068 88. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2000). **Obesity: preventing and managing the**
1069 **global epidemic**. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894):
1070 252p.
1071
- 1072 89. YAMAGUCHI, K.; ITOH, Y.; YOKOMIZO, C.; et al. Blockade of interleukin-6 signaling
1073 enhances hepatic steatosis, but improves liver injury in methionine choline -deficient diet-
1074 fed mice. **Lab Invest**, v. 90, p. 1169-78, Aug 2010.
1075
- 1076 90. YASUMI, Y.; TAKIKAWA, Y.; ENDO, R.; et al. Interleukin-17 as a new marker of
1077 severity of acute hepatic injury. **Hepatol Res**, v. 37, n. 4, p. 248-54, Apr 2007.
1078
- 1079 91. ZHAN, Y. T.; AN, W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver
1080 disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 37, p. 4652-60, Oct 07 2010.
1081

1082 92. ZIVKOVIC, A. M.; GERMAN, J. B.; SANYAL, A. J. Comparative review of diets for the
1083 metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**, v.
1084 86, n. 2, p. 285-300, Aug 2007.

1085

1086

1087

Anexo I
Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-061/2015

Uberaba, 25 de maio de 2015.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 036/2014 relativo ao projeto intitulado "*Análise bioquímica e histológica de ratos wistar jovens submetidos a uma dieta hiperlipídico-proteica*" que tem como responsável **Prof. Marcelo Rodrigues Pinto**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 036/2014 related to the project entitled "***Biochemical and histological analysis of Wistar rats subjected to a young hyperlipidic determining protein- diet***", under the supervision of Prof. Marcelo Rodrigues Pinto, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,

Prof. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE

1088