

## DIETA HIPERLIPÍDICA INDUZ DANOS HEPÁTICOS ASSOCIADOS À DHGNA SEM DESEQUILÍBRIO REDOX NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS SWISS

*(Hyperlipid diet induces NAFLD associated liver damage without redox imbalance in Swiss mice liver)*

Paula Alexandre de FREITAS<sup>1</sup>; Keciany Alves de OLIVEIRA<sup>2\*</sup>; Marcos Aurélio de Sousa LIMA<sup>1</sup>; Neucilane Silveira dos SANTOS<sup>3</sup>; Pedro Marcos Gomes SOARES<sup>1</sup>; Luciana Catunda BRITO<sup>4</sup>; Ariclécio Cunha de OLIVEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, CE. CEP: 60.740-000; <sup>2</sup>Mestrado Acadêmico em Nutrição e Saúde (UECE);

<sup>3</sup>Curso de Nutrição (UECE); <sup>4</sup>Instituto de Educação Física e Esportes (UFC).

\*E-mail: [paulaalexandref@gmail.com](mailto:paulaalexandref@gmail.com)

### RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença de prevalência crescente e fortemente associada ao desequilíbrio redox e à perda da homeostase glicêmica. O desenvolvimento de modelos *in vivo* que mimetizem características fisiopatológicas da mesma é essencial para a descoberta e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Validar um modelo de DHGNA associado ao desequilíbrio redox e à intolerância à glicose, induzida por dieta hiperlipídica, de baixo custo e fácil reprodutibilidade. Dezesesseis camundongos Swiss receberam dieta hiperlipídica, durante 10 semanas. Durante todo o experimento foram avaliados peso corporal, tolerância à glicose, marcadores do estresse oxidativo e morfologia hepática. A dieta hiperlipídica promoveu um aumento significativo dos níveis de triglicerídeos ( $p < 0,05$ ) e do peso do tecido hepático ( $p < 0,01$ ), além de severa inflamação, necrose e esteatose dos hepatócitos. Os animais que seguira a DH (dieta hiperlipídica) apresentaram ainda, uma menor tolerância à glicose ( $p < 0,05$ ), entretanto não apresentaram redução dos grupamentos tióis. O modelo de DHGNA, induzida por DH, foi associada a danos histológicos hepáticos e à intolerância à glicose, entretanto não apresentou desequilíbrio redox, sendo um modelo inviável para estudos com tratamentos com antioxidantes. O trabalho teve por objetivo validar um modelo de DHGNA induzido por dieta hiperlipídica associada a alterações na resposta glicêmica e sem modificações na homeostase redox em camundongos.

**Palavras-chave:** Doença hepática gordurosa, dieta hiperlipídica, desequilíbrio redox, camundongo.

### ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasingly prevalent disease strongly associated with redox imbalance and loss of glycemic homeostasis. The development of *in vivo* models that mimics its pathophysiological characteristics is essential for the discovery and development of therapeutic strategies. To validate a NAFLD model associated with redox imbalance and low-fat diet-induced glucose intolerance and easily reproducible. Sixteen Swiss mice received a high fat diet for 10 weeks. Throughout the experiment, body weight, glucose tolerance, oxidative stress markers and liver morphology were evaluated. The hyperlipid diet promoted a significant increase in triglyceride levels ( $p < 0.05$ ) and liver

tissue weight ( $p<0.01$ ), in addition to severe inflammation, necrosis and steatosis of hepatocytes. The animals that followed the hyperlipidic diet (HD) still had a lower glucose tolerance ( $p<0.05$ ), however it did not show reduction of thiol groups. The HD-induced NAFLD model was associated with liver histological damage and glucose intolerance, however it did not present redox imbalance, being an unfeasible model for studies with antioxidant treatments. The study aimed to validate a model of NAFLD induced by a high-fat diet associated with changes in the glycemic response and without changes in redox homeostasis in mice.

**Key words:** Fatty liver disease, hyperlipid diet, redox imbalance, mice.

## INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracteriza-se pelo acúmulo de gordura hepática e, tem se destacado no cenário mundial como uma epidemia crescente. Desordens metabólicas como o desequilíbrio redox e o estado inflamatório se apresentam como características da doença, somados a fatores de risco como a obesidade e a resistência à insulina, diretamente relacionadas a esse acúmulo de gordura no fígado (PATEL *et al.*, 2016; BENEDICT *et al.*, 2017).

O acúmulo de lipídios no tecido hepático desenvolve-se quando a captação de ácidos graxos livres e síntese de triglicerídeos é maior que a oxidação desses ácidos graxos (FABBRINI *et al.*, 2010), podendo gerar sérios danos ao fígado, desde a esteatose simples até o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica, que representa a forma inflamatória da doença, e pode levar à fibrose avançada, cirrose e hepatocarcinoma (ÂNGELO, 2002; MACHADO e CORTEZ 2014; BUZZETTI *et al.*, 2016).

Embora existam diversos mecanismos propostos para a instalação da doença, propõe-se que ela ocorra em múltiplas fases. O consumo de dietas hiperlipídicas leva a desordens no processo de absorção, síntese, degradação e secreção de ácidos graxos pelo fígado, desencadeando resistência à insulina e acúmulo ectópico de gordura no tecido hepático. Esse processo, juntamente com a instalação do desequilíbrio redox, promove o aumento da produção de citocinas inflamatórias, e consequente progressão da doença (AHMED, 2015).

Esse processo crônico gera uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução da defesa antioxidante (BUZZETTI *et al.*, 2016). Embora o organismo apresente uma defesa antioxidante endógena composta por enzimas, como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), o desequilíbrio entre os fatores oxidantes e a defesa antioxidante, que pode ser ocasionado pela DH, irá resultar no estresse oxidativo, causando um dano celular (WANG *et al.*, 2018).

O desequilíbrio redox ocorre em muitas doenças, particularmente naquelas com caráter inflamatório, como as doenças hepáticas, que apresentam altos níveis de ERO. Estudos realizados em humanos e modelos animais mostraram uma forte associação entre o nível de ERO e a gravidade da esteatose hepática, além de níveis elevados de peroxidação lipídica (KNEEMAN *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de modelos *in vivo* que apresente características da patologia da DHGNA é essencial para a descoberta e o desenvolvimento de novas estratégias

terapêuticas. Dessa forma, muito se tem postulado sobre a patogênese e progressão da DHGNA (AHMED, 2015). Diante disso, buscou-se validar um modelo de DHGNA induzido por dieta hiperlipídica associada a alterações na resposta glicêmica e sem modificações na homeostase redox em camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais Experimentais

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE) (número: nº 7292555/2017). Foram utilizados 16 Camundongos *Swiss* machos, recém-desmamados (21 dias), obtidos do Biotério da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os camundongos foram mantidos no biotério de experimentação do Instituto Superior de Ciências Biomédicas em caixas coletivas (46 x 24 x 20cm, com 3 - 4 animais/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25 °C, ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 6:00h).

Após uma semana de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (CT) (n=8), que recebeu dieta padrão (Presence<sup>®</sup>), e grupo que recebeu dieta hiperlipídica (HFD) (n=8), e receberam água ‘ad libitum’, por 12 semanas.

### Preparação da dieta Hiperlipídica

A dieta hiperlipídica foi preparada no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Ceará (UFC), composta por (5kg): 1875 g de ração padrão, 1250 g de chocolate ao leite, 1250 g de amendoim sem sal e sem pele e 625g de biscoito de maisena, resultando em uma proporção de 14 % de proteína, 38 % de carboidrato, 48 % de lipídeos. Durante o experimento, a avaliação do consumo de ração e água foi realizada diariamente e o peso corporal dos animais, verificado duas vezes por semana.

### Teste de tolerância a glicose

No final das 12 semanas foi realizado o teste oral de tolerância à glicose (GTT<sub>o</sub>). Animais em jejum de 10h receberam 75mg/100g de glicose por gavagem. As amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A partir dos valores das curvas glicêmicas de cada animal, calculou-se a área incremental sob curva (AUC) utilizando-se o Software Gran Prima 7.0.

Dois dias após o GTT<sub>o</sub> os animais foram eutanasiados conforme às exigências preconizadas pelo CEUA-UECE, e o fígado foi coletado, pesado, e armazenado a -80 °C.

A partir do fígado foram realizados: dosagem de triglicerídeos, quantificação de tiol, atividade enzimática da CAT, GPx e SOD, e análise histológica.

### Dosagem de Triglicerídeos

A dosagem de triglicerídeos foi realizada por meio do método colorimétrico enzimático, utilizando kit de reagentes comerciais da marca Labtest<sup>®</sup>. O método consiste na

hidrólise dos triglicerídeos pela lipase, liberando o glicerol, que é convertido, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. Em seguida ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo quinoneimina que tem máximo de absorvância em 505nm, e a leitura é realizada em espectrofotômetro.

### **Quantificação de Grupamentos tiol**

A quantificação de grupamentos tiol livre no tecido utilizou o reagente ácido dithionitrobenzóico (DTNB) em espectrofotômetro (Hitachi U-3300). O tiol reage com o DTNB clivando o disulfeto ligado à molécula, levando à formação de 2-nitro-5-benzoato (NTB-), que se ioniza a NTB<sup>2-</sup> em meio aquoso em pH neutro ou alcalino. O NTB<sup>2-</sup> foi quantificado em espectrofotômetro utilizando a absorvância da luz visível a 412 nm.

### **Determinação da atividade das Enzimas Antioxidantes**

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada por meio do desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formando água e oxigênio. A atividade da CAT foi obtida por meio da diferença entre a taxa de diminuição da absorvância com e sem homogenato, sendo calculada por meio da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (43,6M<sup>-1</sup>) (AEBI, 1984).

Para a análise da SOD, foi utilizado kit comercial Ransod<sup>®</sup> (Randox<sup>®</sup>, Reino Unido, 2018). O método de determinação da SOD baseia-se na reação entre a xantina e a xantina oxidase para produção de radicais superóxido, os quais reagem com um substrato cromogênico, reduzindo-o e levando à produção de um composto de cor vermelha. A atividade da enzima é mensurada pela sua capacidade de inibir essa reação, assim, uma unidade de SOD é considerada a quantidade capaz de inibir 50% da taxa de redução do substrato. A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

O método de determinação da atividade da GPx baseia-se na reação em que a GPx catalisa a oxidação da glutathiona reduzida por um peróxido de hidrogênio. Na presença de GPx e NADPH, a glutathiona oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em NADH<sup>+</sup>. Para tal, foi utilizado o Kit comercialmente disponível RANSEL da Randox<sup>®</sup>. A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

### **Análise Histológica**

Os tecidos hepáticos foram fixados em formalina a 10% e corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi então realizada sob microscópio e pontuou dados histopatológicos por meio do sistema de pontuação baseado em três critérios: esteatose, inflamação e necrose (min = 0, max = 3), de acordo com um método previamente descrito (KLEINER *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2017).

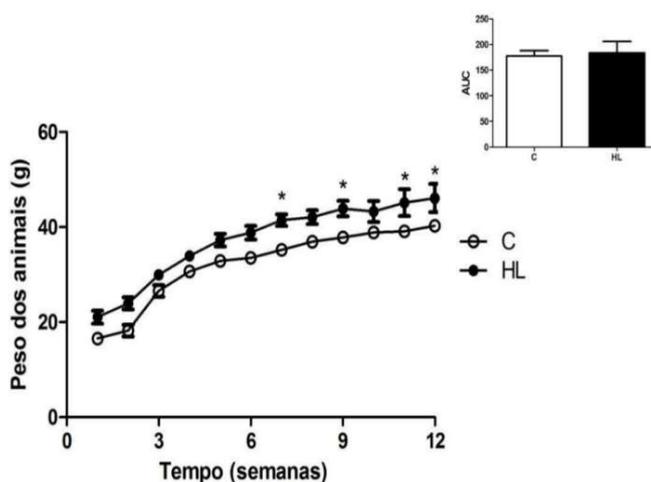
### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média±SEM. O teste one-way ANOVA com medida repetida seguido por pós teste por Bonferroni foi usado para comparar a evolução da glicemia no teste de tolerância. Para as outras comparações, o teste one-way ANOVA

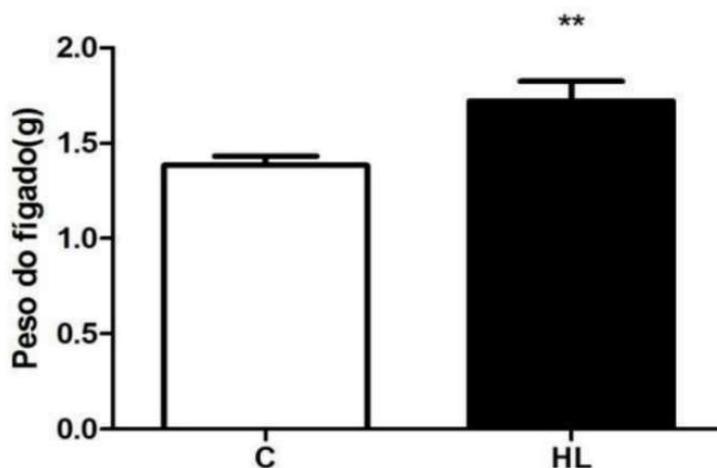
seguido por pós teste de Bonferroni foi adotado. Diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0.05$ . As análises foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism versão 7.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

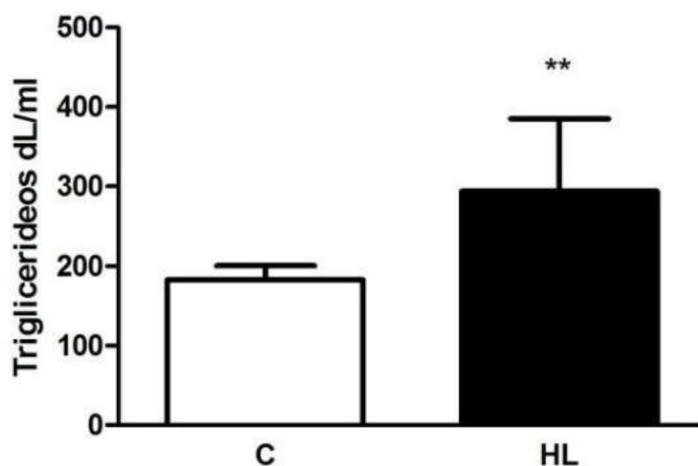
Ao realizar a avaliação da evolução ponderal, foi possível observar que a partir da 7ª semana do experimento houve diferença significativa do peso corporal entre os dois grupos (Fig. 01a). A dieta hiperlipídica também promoveu aumento significativo do peso do tecido hepático, quando comparado aos animais da dieta controle (Fig. 01b). Além disso, foi observado um aumento significativo dos níveis de triglicerídeos no fígado dos animais do grupo HL, observado na Fig. 01c.



**Figura 01a:** Evolução do peso corporal entre os grupos controle (C) e hiperlipídico (HL). (\* $p < 0.05$ . ANOVA Two-way seguido do teste de Bonferroni.  $n = 6-7$ ).

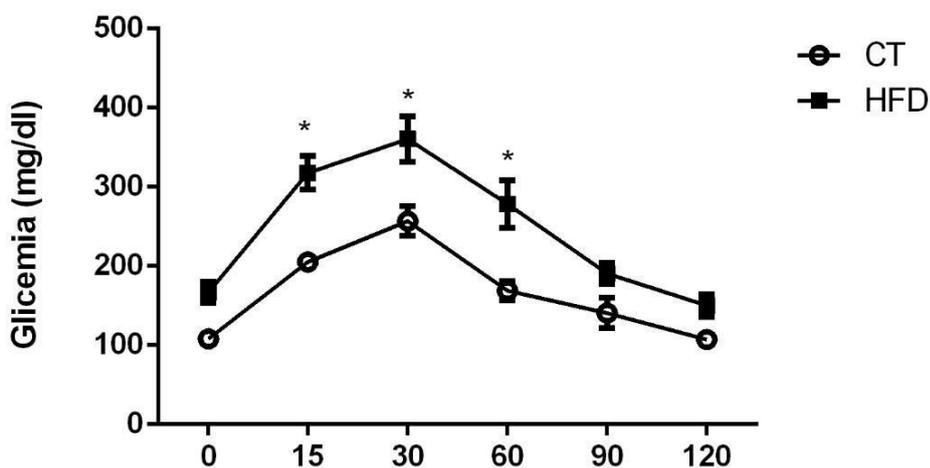


**Figura 01b:** Peso do fígado dos grupos controle (C) e hiperlipídico (HL). (\*\* $p < 0.01$ . ANOVA Two-way seguido do teste de Bonferroni.  $n = 6-7$ ).



**Figura 01c:** Dosagem de triglicerídeos dos grupos controle (C) e hiperlipídico (HL). (\*\* $p < 0,01$ . ANOVA Two-way seguido do teste de Bonferroni.  $n = 6-7$ ).

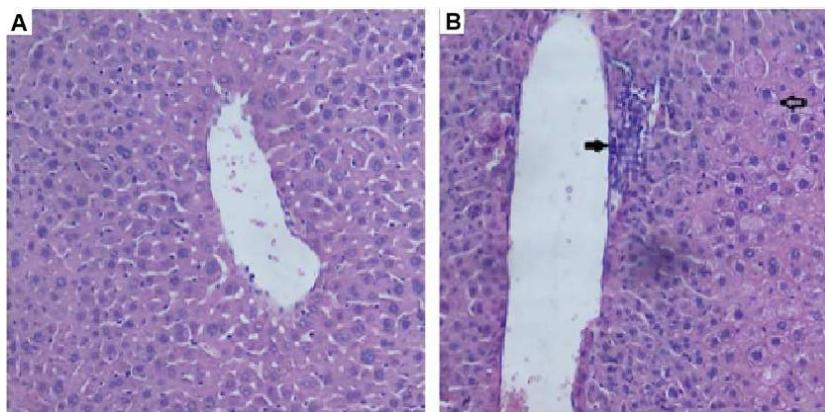
Em relação ao teste oral de tolerância à glicose (Fig. 02), foi observado que os animais HL apresentaram uma menor tolerância à glicose em relação ao grupo C, com diferença estatística nos tempos 15, 30, e 60 minutos.



**Figura 02:** Teste de tolerância à glicose.

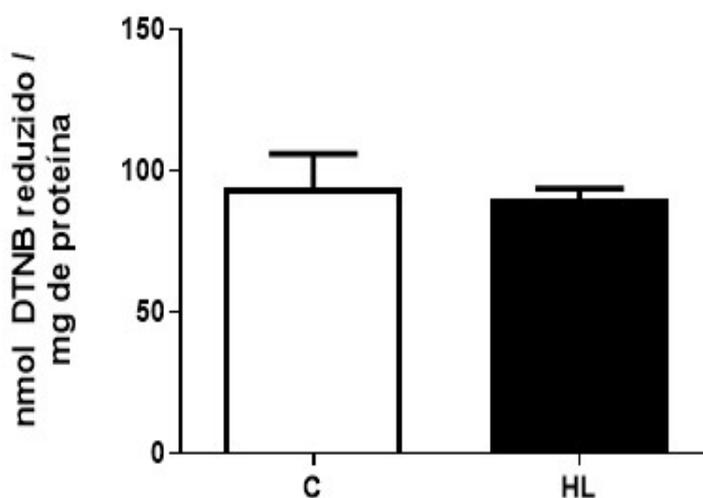
**Obs.:** Glicemia 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de sobrecarga (gavagem) de glicose após 12 semanas de consumo de dieta normocalórica (C) e dieta hiperlipídica (HL) \*Estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,001$ ). ANOVA Two-way seguido do teste de Bonferroni. ( $n = 6-7$ ).

Quanto à análise histológica, os animais do grupo controle não apresentaram dano hepático. Contudo, nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica observou-se severo infiltrado inflamatório, necrose e esteatose dos hepatócitos, conforme indicado na Fig. 03.



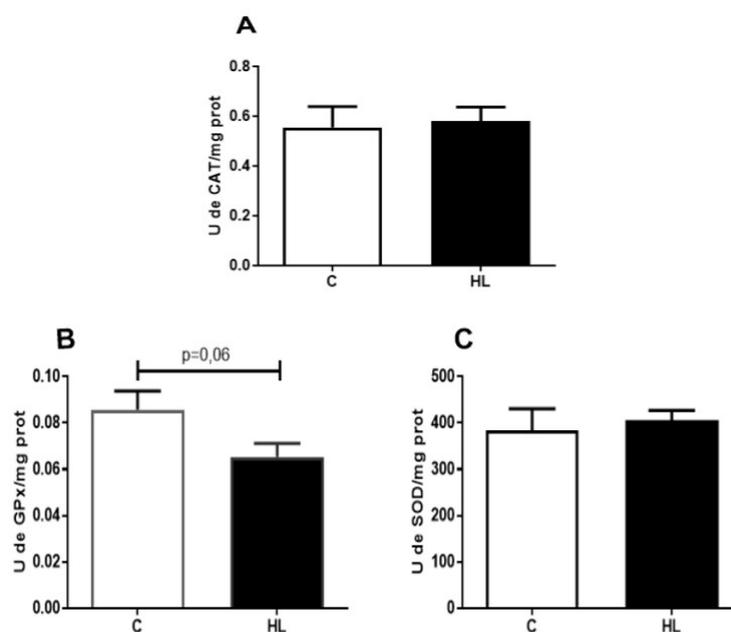
**Figura 03:** Cortes histológicos do fígado de animais controle (A) e tratados com dieta hiperlipídica (B) em coloração HE; x10. Obs.: A seta cheia: infiltrado inflamatório; seta vazia: necrose e esteatose.

Em relação ao equilíbrio redox, não foi observado dano oxidativo pela análise do tiol (Fig. 04a). Além disso, ao analisar a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT) não houve diferença significativa entre o grupo HL comparado ao grupo CT como podemos observar na Fig 04b.



**Figura 04a:** Dano oxidativo: Dosagem de tiol. (ANOVA teste t (n= 6-7).

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que a dieta hiperlipídica por 12 semanas induziu à instalação da DHGNA em camundongos, com a presença de esteatose, inflamação e necrose hepática, além de alterações na resposta glicêmica. Entretanto, mostrou-se inviável para estudos de desequilíbrio redox observado na doença, visto que, não apresentou diferença no dano oxidativo e na atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático.



**Figura 04b:** Defesa antioxidante: (A) Catalase. (B) Glutathioneperoxidase. (C) Superóxido dismutase. ANOVA teste t (n= 6-7).

Um aspecto importante que deve ser analisado, consiste no tempo necessário para instalação da doença. Embora estudos tenham demonstrado o aumento do peso do tecido hepático e acúmulo de triglicérides nos hepatócitos entre 6 e 9 semanas de dieta hiperlipídica (MARCIANO *et al.*, 2017; MIRANDA *et al.*, 2018), não foram observadas alterações histológicas no tecido hepático, necessárias para caracterização do diagnóstico da doença, como relatados nessa pesquisa, após 12 semanas de dieta hiperlipídica.

Contudo, um modelo adequado de estudo para DHGNA deve apresentar, além das características estruturais do tecido, suas complicações metabólicas, como alteração da resposta glicêmica e da sensibilidade à insulina, aspectos importantes da doença. Em estudo com ratos wistar foi demonstrado que, além de alterações do perfil lipídico, uma dieta hiperlipídica por 8 semanas foi suficiente para gerar alterações na sensibilidade periférica à insulina, porém, sem alterações na resposta glicêmica e sem alterações histológicas (MOURA *et al.*, 2012).

Outros estudos com ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica, por no mínimo 10 semanas, verificaram alterações da sensibilidade à insulina, como também da resposta glicêmica, com instalação da resistência à insulina (ŽENDZIAN *et al.*, 2018). White *et al.* (2013) ao realizarem o teste de tolerância à glicose intraperitoneal em camundongos *Swiss* tratados com dieta hiperlipídica por 10 semanas, também observaram que, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica apresentou menor tolerância à glicose, em consonância com os resultados encontrados no estudo em questão.

A caracterização da DHGNA se dá por meio da análise histológica do tecido hepático, pela presença de esteatose, inflamação e necrose hepática, assim como pela

instalação do desequilíbrio redox, observado pelo dano oxidativo e redução da atividade das enzimas antioxidantes.

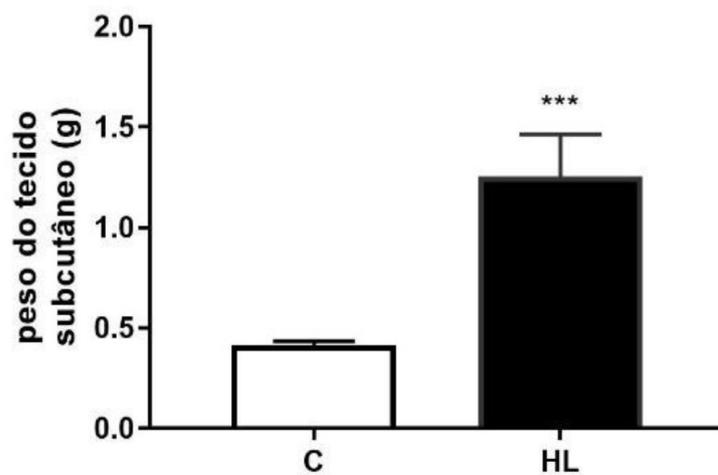
Experimento de indução à esteatohepatite não-alcoólica com ratos *Wistar* machos e camundongos machos C57/BL6 demonstrou que os ratos *Wistar* estão associados a maior grau de esteatose e que camundongos machos C57/BL6 desenvolvem mais inflamação e necrose, peroxidação lipídica e lesão ultra estrutural, e apresentam características histológicas da doença com a dieta deficiente em metionina e colina, importantes nutrientes para  $\beta$ -oxidação mitocondrial hepática e para produção de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Além disso, a redução desses nutrientes, também aumenta a captação de ácidos graxos livres pelo fígado (KIRSCH *et al.*, 2003).

Bagci *et al.* (2019) ao trabalharem com camundongos *Swiss* para induzir a DHGNA utilizando dieta baseada em 30% de solução de frutose por 70 dias, observaram as características da doença com aumento de marcadores de estresse oxidativo, sugerindo que um dos efeitos do medicamento utilizado foi a redução desses marcadores, evidenciando a importância dessa característica na patogênese da doença.

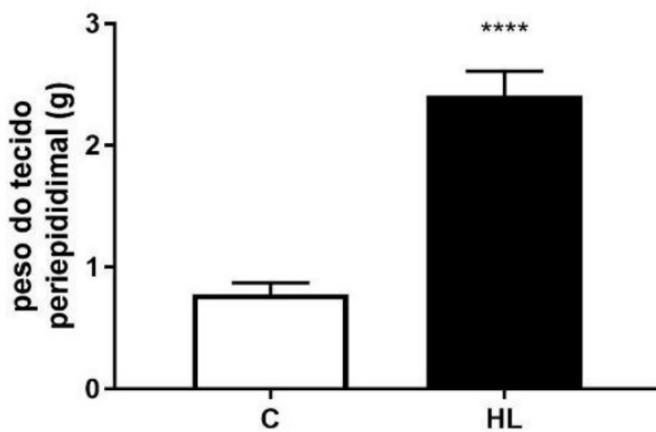
Estudos com dieta hiperlipídica (HFD) têm demonstrado a instalação das alterações no tecido hepático da DHGNA, porém não avaliam os marcadores do desequilíbrio redox. Nie *et al.* (2018) utilizaram ratos alimentados com dieta HFD rica em gordura e açúcar, durante 12 semanas, e observaram por meio de análise histológica alterações hepáticas, como infiltração de gordura e instalação de necrose, porém, não analisaram dano oxidativo, característico dessa doença. O mesmo tipo de dieta experimentada em camundongos C57BL/6J, mas com proporções diferentes de gordura (60% e 37%), ocasionou hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, esteatose hepática e intolerância à glicose, entretanto, não avaliaram parâmetros do estresse oxidativo (ITO *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2005). Enquanto Zhu *et al.* (2017) ao avaliarem o desenvolvimento da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica em ratos, por 16 semanas, verificaram presença de inflamação hepática, resistência à insulina e peroxidação lipídica. Por fim, estudo utilizando dieta HFD com menor porcentagem de gordura (35% do total de calorias do óleo de milho), por 3 semanas, induziu a doença em ratos, com presença de 4-hidroxinonenal, um metabólito da peroxidação lipídica (Lieber *et al.*, 2004).

Nesse contexto, observa-se que a escolha do tipo de dieta para estudos terapêuticos da DHGNA é bastante importante, visto que variam nas características da doença. Assim, deve-se avaliar a indução do modelo experimental que melhor se adeque ao objetivo do estudo. Contudo, a dieta hiperlipídica utilizada em nosso estudo, com 48% de gordura por 12 semanas, não causa todas as características da doença em camundongos *Swiss*, sendo não recomendada esse tipo de dieta para estudos que avaliem a capacidade antioxidante de compostos nesse modelo de indução experimental da doença.

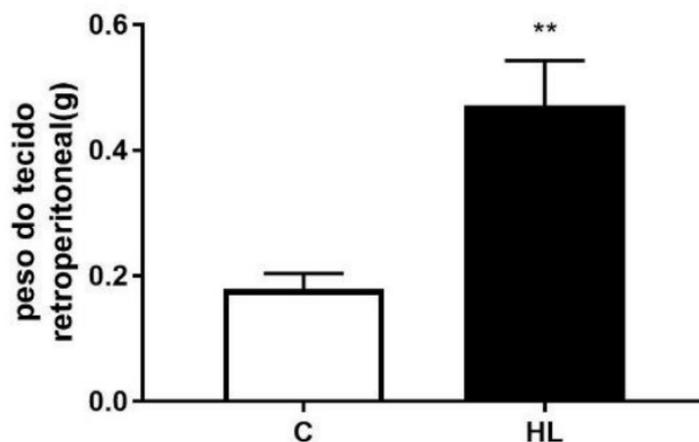
Vale ressaltar o efeito da dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo no tecido adiposo de camundongos. O aumento da adiposidade foi observado, após 12 semanas de dieta hiperlipídica, com aumento significativo dos três coxins avaliados, tecido subcutâneo (Fig. 05a), peritoneal (Fig. 05b) e retroperitoneal (Fig. 05c) do grupo HL comparado ao grupo C. O aumento da adiposidade está relacionado com a esteatose hepática (WHITE *et al.*, 2013).



**Figura 05a:** Peso do tecido adiposo Subcutâneo. ANOVA teste T (n= 6-7).



**Figura 05b:** Peso do tecido adiposo Periepididimal. ANOVA teste T (n= 6-7).



**Figura 05c:** Peso do tecido adiposo Retroperitoneal. ANOVA teste T (n= 6-7).

### CONCLUSÕES

Embora na literatura ainda não exista um modelo experimental que reproduza fielmente todas as características da DHGNA em humanos, eles são essenciais para aprofundar o conhecimento acerca da patogênese e tratamento da doença. Contudo, a dieta hiperlipídica com 48 % de gordura por 12 semanas em camundongos *Swiss* não é um modelo apropriado para pesquisas que buscam o tratamento do desequilíbrio redox na doença, visto que esse modelo de indução não apresenta as alterações nos marcadores do estresse oxidativo.

### AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro oferecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, v.105, p.121-126, 1984.
- AHMED, M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World Journal of Hepatology*. v.7, n.11, p.1450-1459, 2015.
- ÂNGELO, P.M.D. Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, v.346, n.16, p.1221-1231, 2002.
- BAGCI, R.; SAHINTURK, V.; SAHIN, E. Azoramide ameliorates fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Tissue and Cell*, v.59, p.62-69, 2019.
- BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology*, v.9, n.16, p.715-732, 2017.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E.A. The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolismo*, v.65, n.8, p.1038-1048, 2016.

DENG, Q.G.; SHE, H.; CHENG, J.H.; FRENCH, S.W.; KOOP, D.R.; XIONG, S.; TSUKAMOTO, H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology*, v.42, n.4, p.905-914, 2005.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, v.51, n.2, p.679-89, 2010.

HE, C.; GUO, X.; FAN, J.; XU, Z. Different dietary contribution to hepatic inflammatory and lipogenic factor mRNA expression. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v.10, n.1, p.325-333, 2017.

ITO, M., SUZUKI, J., TSUJIOKA, S., SASAKI, M., GOMORI, A., SHIRAKURA, T.; HIROSE, H.; ITO, M.; ISHIHARA, A.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Research*, v.37, n.1, p.50-57, 2007.

KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; VAN, N.M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W.; FERRELL, L.D.; LIU, Y.C.; TORBENSON, M.S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A.J.; SANYAL, A.J. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v.41, n.6, p.1313-1321, 2005.

KNEEMAN, J.M.; LEGHI, G.E.; DOMENICI, F.A.; VANNUCCHI, H. Influence of oxidative stress and obesity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Arquivos de Gastroenterologia*, v.52, n.3, p.228-233, 2015.

LIEBER, C.S.; LEO, M.A.; MAK, K.M.; XU, Y.; CAO, Q.I.; REN, C.; PONOMARENKO, A.; DECARLI, L. M. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, n.3, p.502-509, 2004.

MACHADO, M.V.; CORTEZ, P.H. Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World Journal of Gastroenterology*, v.20, n.36, p.12956-12980, 2014.

MARCIANO, R.C.; URIAS, G.M.P.C.; CARVALHO, C. Esteatose hepática em ratos com obesidade induzida. *Revista Ciência e Saúde On-line*, v.2, v.3, p.19-24, 2017.

MIRANDA, J.; ESEBERRI, I.; LASA, A.; PORTILLO, M.P. Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v.74, n.4, p.655-666, 2018.

MOURA, L.P.; DALIA, R.A.; ARAÚJO, M.B.; SPONTON, A.C.S.; PAULI, J.R.; MOURA, R.F.; MELLO, M.A.R. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. *Revista de Nutrição*, v.25, n.6, p.685-693, 2012.

NIE, J.; LI, C.; LI, J.; CHEN, X.; ZHONG, X. Analysis of non-alcoholic fatty liver disease microRNA expression spectra in rat liver tissues. *Molecular Medicine Reports*, v.18, n.3, p.2669-2680, 2018.

PATEL, V.; SANYAL, A.J.; STERLING, R. Clinical presentation and patient evaluation in nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in Liver Disease*, v.20, n.2, p.277-292, 2016.

KIRSCH, R.; CLARKSON, V.; SHEPHARD, E.G.; MARAIS, D.A.; JAFFER, V.E.; WOODBURN, R.E.; HALL, P.D.L.M. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.18, n.11, p.1272-1282, 2003.

RANGNEKAR, A.S.; LAMMERT, F.; IGOLNIKOV, A.; GREEN, R.M. Quantitative trait loci analysis of mice administered the methionine–choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver International*, v.26, n.8, p.1000-1005, 2006.

WANG, R.S.; OLDHAM, W.M.; MARON, B.A.; LOSCALZO, J. Systems Biology Approaches to Redox Metabolism in Stress and Disease States. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.29, n.10, p.953-972, 2018.

WHITE, P.A.S.; CERCATO, L.M.; ARAÚJO, J.M.D.; SOUZA, L.A.; SOARES, A.F.; BARBOSA, A.P.O.; NETO, J.M.R.; MARÇAL, A.C.; MACHADO, U.F.; CAMARGO, E.A.; SANTOS, M.R.V.; BRITO, L.C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância a glicose. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v.57, n.5, p.339-45, 2013.

ŻENDZIAN-PIOTROWSKI, M.; LUKASZUK, B.; MACIEJCZYK, M.; OSTROWSKA, L.; ZALEWSKA, A.; CHABOWSKI, A.; KUREK, K. High-fat, high-protein and high-carbohydrate diet affect sphingolipid profile in pancreatic steatosis in wistar rats. *Nutrition*, v.11, n.60, p.197-205, 2018.

ZHU, C.; LIU, Y.; WANG, H.; WANG, B.; QU, H.; WANG, B.; ZHU, M. Active form of vitamin D ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress in a high-fat diet rat model. *Endocrine Journal*, v.64, n.7, p.663-673, 2017.