ELIANA PINHEIRO DA SILVA

**Modelo experimental para indução da esteatose hepática e
esteatohepatite: estudo em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro
D'Albuquerque

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Eliana Pinheiro da
Modelo experimental para indução da esteatose hepática e esteatohepatite : estudo
em ratos / Eliana Pinheiro da Silva. . -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Luis Augusto Carneiro D´Albuquerque.

Descritores: 1.Fígado gorduroso 2.Esteato hepatite 3.Fibrose hepática
4.Carcinoma hepatocelular 5.Ratos Sprague-Dawley

USP/FM/DBD-239/12

“Há homens que lutam um dia, e são bons
Há homens que lutam um ano, e são melhores
Há homens que lutam muitos anos, e são muito
bons
Porém há os que lutam por toda vida
Estes são imprescindíveis”

Bertold Brecht.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Diamantina e Manoel que nunca cansaram de guiar meus passos.

Aos meus irmãos pelo constante incentivo em minha carreira profissional.

Aos meus filhos, Gabriela e Guilherme que fazem tudo valer à pena.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, berço de infinita sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Este instante é, para mim, de suma importância. Manifesto minha profunda gratidão a esta plêiade de amigos e mestres que souberam dar o incentivo, coragem e ensinamentos fundamentais para o alcance do meu objetivo.

Ao professor Doutor **IVAN CECCONELLO**, pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor **FLAIR JOSÉ CARRILHO**, por ter permitido e incentivado o início deste estudo e ter acreditado no meu trabalho.

Ao Professor Doutor **LUIZ AUGUSTO CARNEIRO D'ALBUQUERQUE**, modelo como pessoa e médico, cientista profícuo. Legítimo orgulho da moderna cirurgia brasileira. Responsável direto, através de seu estímulo e compreensão pela realização deste trabalho. Orientador seguro e eficiente foi mestre e amigo.

Ao Professor Doutor **WILLIAM ABRÃO SAAD**, pelos ensinamentos seguros e preciosos, pelas portas sempre abertas e pela oportunidade concedida de poder aprender com um Mestre, amigo e grande ser humano, de incansável fôlego produtivo, que de maneira singular consegue se tornar inesquecível para todos os seus discípulos estimulando-os a crescer e a continuarem pesquisando.

À Professora Doutora **CLAUDIA PINTO MARQUES SOUZA DE OLIVEIRA**, pela paciência, carinho, apoio e dedicação em todas as etapas deste trabalho.

À Doutora **VICÊNCIA MARA RODRIGUES DE LIMA**, pelo agradável convívio e inestimável colaboração na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor **VENÂNCIO AVANCINI FERREIRA ALVES** e Doutor **BRUNO CONGLIATI** pela grande colaboração neste estudo realizando a análise histológica das amostras de tecido hepático.

Ao técnico do LIM 07, **JOSÉ EDSON PEREIRA** pela grande amizade compartilhada e valiosa colaboração na realização dos experimentos.

À Professora Doutora **MARIA DE LOURDES LOPES CAPACCI**, por ter contribuído para meu amadurecimento científico, humano e profissional.

À bibliotecária **MARTA REGINA RODRIGUES**, pelo incansável auxílio na revisão bibliográfica.

À todos os **funcionários** do Curso de Pós Graduação pelo carinho e amizade sempre dispensados.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Dedicatória	
Agradecimentos	
Resumo	
Summary	
Lista de abreviaturas	

1. Introdução.....	1
1.1 Conceito.....	2
1.2 Epidemiologia.....	4
1.3 Fatores predisponentes e aspectos fisiopatogênicos.....	5
1.4 Objetivo.....	13
2. Materiais e Métodos.....	14
2.1 Animais.....	15
2.2 Locais de experimentos.....	24
2.3 Preparação e delineamento experimental.....	25
2.4 Análise histopatológica.....	25
2.5 Análise estatística.....	28
3. Resultados.....	29
3.1 Peso dos animais.....	30
3.1.1 Peso dos animais do grupo 1.....	30
3.1.2 Peso dos animais do grupo 2.....	35
3.2 Peso do fígado dos animais.....	41
3.2.1 Peso do fígado dos animais do grupo 1.....	41
3.2.2 Peso do fígado dos animais do grupo 2.....	42
3.2.3 Percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do grupo 1.....	43
3.2.4 Percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do grupo 2.....	44
3.3 Avaliação histológica do fígado.....	45
3.3.1 Avaliação histológica dos fígados dos animais do grupo 1.....	45
3.3.2 Avaliação histológica dos fígados dos animais do grupo 2.....	47
3.3.3 Análise comparativa dos modelos de esteatohepatite não alcoólica pela dieta deficiente em colina e hiperlipídica em 4 e 8 meses.....	48
3.3.4 Morte de um animal.....	52
4. Discussão.....	57
5. Conclusões.....	66
6. Referências.....	68

RESUMO

Da Silva EP. Modelo experimental para indução da esteatose hepática e esteatohepatite – Estudo em ratos. São Paulo; 2012. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Introdução: A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) tem sido considerada atualmente a forma mais comum de doença hepática no mundo ocidental, relacionada principalmente ao aumento da prevalência da obesidade. A DHGNA abrange um largo espectro de doença, desde casos de esteatose simples (EH) até esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Embora se conheçam os fatores predisponentes para o desenvolvimento de EHNA, sua patogênese, assim como tratamento eficaz, permanecem pouco conhecidos. Os lípidos, principalmente gorduras neutras, fosfolípidios e colesterol, são componentes fundamentais das células, assim como as proteínas e os hidratos de carbono. Embora aumentos marcantes de proteínas e hidratos de carbono não produzam quaisquer alterações macroscópicas no fígado, um acúmulo de gordura é prontamente reconhecido pela coloração amarelada e pelo aumento de volume do órgão. Várias dietas tem sido usadas em animais de laboratórios, principalmente camundongos e ratos no sentido de induzir esteatose, esteatohepatite e fibrose hepática, embora nenhuma delas consiga reproduzir na totalidade os componentes essenciais da doença humana. Não encontramos em nenhum trabalho da literatura a utilização da dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH), por nós utilizada. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH) para desenvolver esteatose hepática, esteatohepatite e fibrose hepática no rato. **Métodos:** A doença hepática foi induzida em ratos Sprague-Dawley machos pesando de 300 a 350 gramas, hospedados em gaiolas padrão e recebendo água à vontade. Foi usada dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH). Os animais foram distribuídos por meio de tabela sequencial randomizada em dois grupos. No grupo 1 dez ratos receberam a dieta por 4 meses e no grupo 2 dez ratos receberam a dieta durante 8 meses. Após o tempo estipulado das dietas os animais foram anestesiados e sacrificados. Os fígados dos animais foram retirados, pesados e enviados para estudo histopatológico de acordo com os critérios estabelecidos por Kleiner. Os animais foram pesados no início do experimento e por ocasião do sacrifício. **Resultados:** o peso dos animais do grupo 1 (DCH – 4 meses) no início do experimento variou de 305 a 350 gramas com média de 329,9 gramas e no fim do experimento de 529 a 615 gramas com média de 579,2 gramas. O percentual de ganho de peso dos animais variou de 60 a 86,93% com média de 75,72%. O peso dos animais do grupo 2 (DCH – 8 meses) no início do experimento variou de 320 a 353 gramas com média de 339,4 gramas e no fim do experimento variou de 661,5 a 783 gramas com média de 705,6 gramas. O percentual do ganho de peso dos animais variou de 95,58 a 123,71% com média de 107,78%. O peso do fígado dos animais do

grupo 1 no fim do experimento variou de 24,5 a 29,5 gramas. O percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do grupo 1 variou de 4,16 a 5,54% com média de 4,75%. O peso do fígado dos animais do grupo 2 no fim do experimento variou de 31 gramas a 39 gramas com média de 33,8 gramas. O percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do grupo 2 variou de 4,63% a 5,07%, com média de 4,78%. A análise histopatológica dos animais do grupo 1 demonstrou intensa balonização e esteatose microgoticular com inflamação lobular; o estadiamento de fibrose foi discreto nestes animais. O estudo histopatológico dos animais do grupo 2 revelou intensa esteatose microgoticular e balonização com inflamação lobular; alguns animais apresentaram esteatose macrogoticular. Os animais deste grupo 2 apresentaram fibrose com grande variação individual. Os animais de ambos os grupos experimentais desenvolveram esteatohepatite, pois apresentaram o índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS) ≥ 5 . A análise comparativa demonstrou não haver diferença estatística no valor do NAS entre os dois grupos experimentais. Em relação ao estadiamento da fibrose na esteatohepatite não alcoólica, os animais do grupo 2 apresentaram uma tendência de escores mais elevados do que os animais do grupo 1. No entanto não houve diferença estatística entre os grupos devido a grande variação individual ($p=0,2755$). **Conclusões:** A dieta DCH administrada durante 4 e 8 meses induziu nos ratos aumento considerável de peso corpóreo e do peso do fígado. Os animais do grupo 1 apresentaram intensa balonização, esteatose microgoticular e inflamação lobular com discreta fibrose hepática. Os animais do grupo 2 apresentaram intensa balonização, esteatose macro e microgoticular, inflamação lobular e maior grau de fibrose hepática, bem estabelecida com formação de colágeno e expansão fibrosa nos espaços vasculares. A dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH) induziu no rato esteatose hepática e esteatohepatite com fibrose, servindo de modelo experimental para proporcionar melhor entendimento para procedimentos terapêuticos futuros desta importante patologia do fígado.

Descritores: Fígado gorduroso 2.Esteato hepatite 3.Fibrose hepática
4.Carcinoma hepatocelular 5.Ratos Sprague-Dawley

SUMMARY

Da Silva EP. Experimental Model for induction of steatosis and steatohepatitis – Study in rats [Dissertation]. São Paulo; 2012. “Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina”.

Introduction: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) has currently been regarded as the most common form of liver disease in the western world, mainly related to the increased prevalence of obesity. NAFLD covers a broad spectrum of diseases, since cases of simple steatosis (HS) to steatohepatitis (EHNA) and fibrosis, and may evolve to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (CHC). Although the predisposing factors for the development of EHNA are well established, there is little knowledge on its pathogenesis as well as the effective treatment options. Lipids, especially phospholipids, neutral fats and cholesterol, are fundamental cell components, as well as proteins and carbohydrates. Although striking increases of proteins and carbohydrates do not produce liver macroscopic changes, fat build up can be rapidly recognized by the yellow coloring and increased organ volume. Many diets have been used in laboratory animals, mainly rats although none of them can fully reproduce the fundamental components of the human disease. We could not find in the literature any study on the use of choline-deficient and hiperlipidic diet (CHD), used in the present study. **Goal:** The objective of this study was to evaluate the effect of a choline-deficient and hiperlipidic diet (CHD) on the development of steatosis, steatohepatitis and hepatic fibrosis in rats. **Methods:** The liver disease was induced in male Sprague-Dawley rats, weighing from 300 to 350 grams, hosted in standard cages and receiving water *ad libitum* and fed with a choline-deficient and hiperlipidic diet (CHD). The experimental animals were distributed by means of a random sequential table in two groups. In Group 1 ten rats received the diet for four months and in Group 2 ten rats received the same diet for eight months. After these predetermined feeding time periods the animals were anesthetized and sacrificed. The animal livers were then removed, weighed and sent to histopathological study according to the criteria established by Kleiner. All the animals were weighed at the beginning of the experiment and by the time of the sacrifice. **Results:** The weight of Group 1 animals (4 months CHD) at the beginning of the experiment varied from 305 to 350 grams with an average of 329.9 grams and at the end of the experiment from 529 to 615 grams averaging 579.2 grams. The percentage of weight gain in animals of this group ranged from 60% to 86.93% with an average of 75.72%. The weight of Group 2 animals (8 months CHD) at the start of the experiment varied from 320 to 353 grams with an average of 339.4 grams and at the end of the experiment from the 661.5 to 783 g with an average of 705.6 grams. The percentage of weight gain in animals of this group varied from 95.58% to 123.71%, averaging 107.78%. The liver weight of Group 1 animals at the end of the experiment varied from 24.5 to 29.5 grams. The percentage of liver weight in relation to the animals' weight, in Group 1, ranged from 4.16% to 5.54%, with an average of 4.75%. The liver weight of Group 2 animals at the end of the experiment varied from 31gramas to 39 grams, with an average of 33.8 gram. The percentage of liver weight in relation to the animals' weight, in Group 2, ranged from 4.63% to 5.07%, with an average of 4.78%. Liver histopathological analysis in Group 1 animals showed

marked ballooning degeneration and microgoticular steatosis with lobular inflammation; fibrosis staging was discreet in these animals. Liver histopathological study in animals of Group 2 showed an intense microgoticular steatosis and ballooning with lobular inflammation; some animals of this group presented macrogoticular steatosis. The amount of hepatic fibrosis in animals of this group was extremely variable. Animals of both experimental groups developed steatohepatitis, as they presented the activity index of nonalcoholic fatty liver disease (NAS) ≥ 5 . Statistical analysis did not show a significant difference between the NAS values of the two experimental groups. Fibrosis staging analysis in non-alcoholic steatohepatitis showed a trend toward higher scores in animals of Group 2 as compared to Group 1 animals. However there was no statistical difference between the groups due to a large individual variation ($p = 0.2755$). **Conclusions:** CHD diet administered for four and eight months induced considerable increases in the rats' body weight and liver weight. Animals in Group 1 showed intense liver ballooning, steatosis and lobular inflammation with discrete microgoticular fibrosis. Animals in Group 2 presented intense ballooning, steatosis macro and microgoticular, lobular inflammation and a higher degree of well-established hepatic fibrosis, with collagen formation with fibrotic expansion in vascular spaces. Choline-deficient and hiperlipidic diet (CHD) in the rat induced hepatic steatosis and steatohepatitis with fibrosis, representing an experimental model, which can provide a better knowledge for future therapeutic procedures of this important liver pathology.

Descrípots: Fatty Liver, Steato Hepatitis, Hepatic Fibrosis, Hepatocellular Carcinoma, Sprague – Dawley rats.

Lista de abreviaturas

DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
CHC	Carcinoma hepatocelular
DCH	Dieta deficiente em colina e hiperlipídica
NAS	Índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
HS	Hepatic steatosis
CHD	Choline deficient and hiperlipidic diet
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
IMC	Índice de massa corpórea
AGL	Ácidos graxos livres
ATP	Trifosfato de adenosina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
O ₂	Radical superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
OH	Radical hidroxila
EROS	Espécies reativas de oxigênio

DNA	Ácido desoxirribonucleico
MDA	Malondialdeido
TNF	Fator de necrose tubular
DCM	Dieta deficiente em colina e metionina
DC	Dieta deficiente em colina
DH	Dieta hiperlipídica
HE	Coloração hematoxilina eosina
PIG	Peso inicial do animal em gramas
PFS(g)	Peso final do animal em sacrifício em gramas
PFS	Peso do fígado do animal por ocasião do sacrifício
PF	Peso do fígado

1. Introdução

1.1 Conceito

Os lípides, principalmente gorduras neutras, fosfolipídios e colesterol, são componentes fundamentais das células, assim como as proteínas e os hidratos de carbono. Embora aumentos marcantes de proteína e hidratos de carbono não produzam quaisquer alterações macroscópicas no fígado, um acúmulo de gordura é prontamente reconhecido pela coloração amarelada e pelo aumento de volume do órgão (Thannhauser et al., 1942).

Desde os primórdios da dissecação pós morte, a evidente alteração anatômica do aumento de gordura no fígado era encontrada em associação com diabetes mellitus, obesidade e infecções (Leevy, 1962), sugerindo um importante papel deste órgão no metabolismo lipídico.

Segundo crônica inglesa, no ano de 1111, um rei norueguês, quando retornava de Jerusalém, fez uma parada em Bizâncio onde vários de seus vassalos morreram. O rei associou essas mortes à ingestão de um vinho considerado "forte".

Um dos cadáveres foi eviscerado e apresentou seu fígado com alterações similares às apresentadas por um fígado de porco, colocado no mesmo vinho (King; Meehan, 1973). Embora com características fantasiosas, foi esta a primeira referência encontrada sugerindo uma relação entre ingestão de bebidas alcoólicas e alterações hepáticas.

A hepatite C é uma epidemia silenciosa, e doença do final da década de 90.

O problema continua. Nos dias atuais, entre 100 doentes que diagnosticamos com hepatite crônica, ou cirrose hepática, 43 têm como causa a infecção pelo vírus da hepatite C (Fonseca, 2006).

A infiltração gordurosa do fígado (esteatose hepática-EH) é uma das alterações hepatocelulares mais frequentes, constituindo-se achado comum em biopsias hepáticas. É consequência do acúmulo no interior dos hepatócitos de ácidos graxos, deslocando o núcleo da célula para a periferia. Constitui achado histológico comum a uma gama de doenças, desde a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), até outras com as quais pode coexistir como hepatite C, doença hepática alcoólica, doença de Wilson, desnutrição, doença celíaca, nutrição parenteral prolongada, lipodistrofias, drogas, betalipoproteinemia, obesidade, diabetes, hipertensão arterial, entre outras.

Embora a patogênese dessas condições tenha fatores propriamente dismetabólicos diferentes, o mecanismo patogênico essencial é desencadeado pelo acúmulo de gordura no hepatócito, e assim surge a esteatose hepática, que pode ser macrovacuolar, microvacuolar, ou mista.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) propriamente dita é uma das formas mais comuns da esteatose hepática no mundo ocidental.

Cientificamente, existem evidências que têm demonstrado que a DHGNA, na sua forma mais grave, que constitui a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) pode evoluir para doença crônica no fígado (cirrose hepática), e carcinoma hepatocelular (CHC) (Powell et al.,1990); (CaldWeell et al.,1999).

A esteatohepatite não alcoólica (EHNA) é doença do novo milênio, também de carácter silencioso, e possui nome difícil para uma doença também de difícil controle e tratamento.

Esteatohepatite não alcoólica (EHNA) ou Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) por ter sido descrita inicialmente em mulheres, obesas e ou diabéticas, sem história de ingestão alcoólica, recebeu várias denominações: hepatite gordurosa, hepatite do diabético, hepatite pseudo-alcoólica, esteato-necrose, e

finalmente, esteatohepatite não alcoólica, sugerida por Ludwig et al.(1980).A EHNA é caracterizada por esteatose macro/microgoticular, infiltrado inflamatório misto, balonização hepatocelular em zona III, podendo apresentar fibrose, corpúsculos de Mallory e cirrose (Brunt, 2005). Esses aspectos morfológicos não são diferentes dos da doença hepática alcoólica, contudo, em indivíduos cujo consumo diário de álcool é inferior a 20-40 gramas.

1.2 Epidemiologia

Estima-se que a prevalência mundial da DHGNA varia de 10 a 40%, na América do Norte, Europa, América do Sul, Austrália, e Japão, sendo a prevalência global em cerca de 20% verificada em estudos de necropsia (Browning et al.,2004) e (Clark, 2002).Cerca de 3% da população mundial é portadora de EHNA, ou seja, aproximadamente 180 milhões de pessoas.

Nos Estados Unidos, a DHGNA tem se constituído na doença hepática mais comum, superando a hepatite C(1,3 a 2,0%), a doença hepática alcoólica(1,0%), a hepatite B(0,3 a 0,4%), e as doenças auto-imunes e metabólicas do fígado.(Browning et al.,2004). Estima-se que mais de 60 milhões de americanos sejam portadores de DHGNA (Clark et al.,2002).

No Brasil, o inquérito realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia relatou 2.232 casos de DHGNA, dos quais 68% tinham EHNA (Cotrim ET AL., 2004).

Essa prevalência alarmante é provavelmente resultado do aumento dos índices de obesidade, diabetes mellitus tipo II e síndrome metabólica. Na população a DHGNA eleva em 3,5 vezes o risco para desenvolver fibrose acentuada e doença crônica hepática. Por outro lado, a alta prevalência não é exclusiva da população caucasiana ocidental. Ao utilizar a ultrassonografia,

Jimba et al.(2005) relataram índices de até 29% de adultos japoneses saudáveis, o que mostra ser uma doença de proporções epidêmicas em diferentes populações.

A prevalência de DHGNA em crianças é de 2,6%, contudo, aumenta para até 53% em crianças obesas, em estudo realizado na população italiana (Saviano et al., 1997).

Em pacientes portadores de obesidade mórbida(IMC>40kg/m²), a prevalência de DHGNA e EHNA é bem maior do que na população não portadora de obesidade mórbida, estando em torno de 95 a 100% e 20 a 50% respectivamente, pois nesses pacientes existem mais fatores de risco para o desenvolvimento da fibrose (Falck-Ytter et al.,2001).

Em 2005, Oliveira et al. relatou em 40 pacientes de obesidade mórbida, uma prevalência de 92% de DHGNA, sendo 46% de EHNA e 48% de esteatose isolada, confirmada por estudos histológicos. Gholam et al.,(2002) e Dixon et al.,(2001), demonstraram, em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica uma prevalência de esteatose que variou de 60 a 98%, de EHNA, de 0,9 a 29%, e de cirrose de 0 a 4%.

Powell et al.,(1990) e Falck-Ytter et al.,(2001) relatam que até 20% dos portadores de EHNA podem evoluir para fibrose e cirrose num período de 7 a 10 anos de evolução.

1.3 Fatores predisponentes e aspectos fisiopatogênicos

Do ponto de vista etiológico existem dois tipos principais de EHNA, primária e secundária. A primária acha-se associada à síndrome metabólica (obesidade-70 a 100%, diabetes mellitus tipo II-35 a 75%, dislipidemia-30 a 80%, e hipertensão arterial).A secundária ocorre em condições como perda de

peso acentuada e rápida em obesos, desnutrição, uso de nutrição parenteral total prolongada, uso de drogas, lipodistrofias, doença de Wilson, abetalipoproteinemia e exposição ocupacional á substâncias voláteis tóxicas, entre outras.

Quanto á classificação da DHGNA temos:

a- Esteatose simples ou pura

b- Esteatohepatite não alcoólica, quando existem as condições:

-Esteatose(predominantemente macrovacuolar)+

Fibrose perissinusoidal, mais acentuada em zonas III ou

Esteatose (predominantemente macrovacuolar)+ Balonização hepatocelular

Quanto ao estadiamento, temos:

0. Sem fibrose

1. Arquitetura preservada, fibrose perissinusoidal limitada ás áreas perivenulares (zonas III)

2. Arquitetura lobular preservada, fibrose perissinusoidal, pericelular com finos septos esparsos, com ou sem expansão de fibrose portal.

3. Arquitetura alterada, com septos unindo estruturas vasculares entre sí; esboço de nódulos

4. Arquitetura predominante nodular. Cirrose Embora se conheçam os fatores predisponentes e se saiba que a esteatose pode evoluir para cronicidade, a verdadeira relação causal entre esteatose simples ou EHNA, fibrogênese e cirrose, assim como sua patogênese, ainda não estão totalmente esclarecidas. Dentre as principais hipóteses consideradas na fisiopatogênese da DHGNA, destaca-se a teoria dos dois "hits" - resistência á insulina como condição inicial (first hit) para o acúmulo de ácidos graxos livres(AGL) no

hepatócito e; -aumento do estresse oxidativo (second hit) no desencadeamento da inflamação e fibrose(EHNA), Day, James(1998).Segundo essa hipótese a hiper-insulinemia (“first hit”) favorece a lipogênese e inibe a lipólise, inclusive no fígado, o que aumenta excessivamente o aporte de ácidos graxos nesse órgão, condições essas favoráveis á infiltração gordurosa hepática (McCullough, 2006).

O tecido adiposo libera gordura na forma de ácidos graxos livres, mediante o estímulo da adrenalina, corticosteróides, e outros hormônios como a insulina. Os AGL têm dois destinos após entrada no hepatócito: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia trifosfato de adenosina (ATP), ou são convertidos novamente em triglicérides, acoplados às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e exportados do fígado para o tecido adiposo. A deposição de triglicérides no interior do hepatócito (esteatose) decorre principalmente da disponibilidade e mobilização de AGL, da síntese hepática aumentada de AGL, e do decréscimo da exportação hepática de triglicérides sob a forma de VLDL. Provavelmente, na DHGNA, exista uma combinação desses fatores intensificados por alterações na lipólise pós prandial relacionada à insulina, a qual provoca aumento de AGL liberados para o fígado. Contudo, na desnutrição calórico-proteica, nas dislipidemias não subordinadas à obesidade, em outras formas de diabetes, e durante o emprego de certas drogas, dificilmente se comprova resistência insulínica, e mesmo nos obesos tal aberração não é achado obrigatório; assim, o mecanismo é complexo.

O estresse oxidativo (“second hit”) gerado nesse contexto seria importante na evolução de esteatose para esteatohepatite e fibrose (Day et al.,1998; Oliveira et al., 2002; Yang et al.,2000; Madan et al., 2006). (Fig.1) Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido à água e nesse processo,

os produtos intermediários são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($OH^\bullet$), que conjuntamente são denominados espécies reativas de oxigênio (EROS). Esses compostos têm meia vida ultracurta, pois a presença de um elétron não-pareado os faz reagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídeos. O estresse oxidativo se estabelece quando as defesas intracelulares antioxidantes são insuficientes para detoxificar as EROS ou também quando há produção excessiva de EROS.

Nesse contexto, o excessivo aporte de AGL ao fígado pode promover esgotamento da oxidação mitocondrial e aumento na produção de EROS, bem como ativação de outras vias de oxidação lipídica (via peroxissomal e microssomal) que geram por sua vez, mais EROS, aumentando o estresse oxidativo hepático. Esse aumento pode causar peroxidação lipídica, cujos produtos intermediários são importantes agentes pró-inflamatórios e parecem ativar as células de ITO, favorecendo a fibrogênese (second hit). Um dos produtos finais da peroxidação de lipídeos é o malondialdeído (MDA) que ativa a produção de colágeno com consequente fibrose (Lee et al., 1995). O processo inflamatório também pode ser desencadeado pelo MDA que ativa citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6, e interleucina 8. Oliveira et al. (2002) demonstraram em ratos que a deposição crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação de lipídeos, e que o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da esteatose. De forma paralela, Oliveira et al. (2005) demonstraram em fígado de pacientes com obesidade mórbida, submetidos à cirurgia de Fobi-Capella, correlação positiva entre a presença de esteatohepatite e o aumento da produção de hidroperóxidos.

Figura 1. Fisiopatogênese da DHGNA

Outro estímulo além do estresse oxidativo, na progressão para a inflamação e fibrose na DHGNA, seria a endotoxemia crônica presente principalmente na obesidade.

A obesidade e a síndrome metabólica são condições inflamatórias que conduzem à aterosclerose e a um processo inflamatório crônico (Stumvoll, 2003; Das, 2002).

A elevação de proteínas de fase aguda e de citocinas pró inflamatórias está demonstrada em obesos que não tiveram traumas, infecções, moléstias auto-imunes, e também não foram operados (Duncan et al., 2000). O tecido adiposo secreta citocinas que atuam em mecanismos responsáveis pela sensibilidade à insulina.

O TNF α é uma citocina que além de participar da resposta imunológica e da etiopatogenia e de algumas neoplasias, também está envolvido na gênese da resistência insulínica, por inibir a fosforilação de receptores de insulina. O TNF α é expresso pelo tecido adiposo e está envolvido em todas as fases de lesão hepática na DHGNA, promovendo a esteatose, estimulando a lipogênese nos hepatócitos, e aumentando a liberação de AGL pelos adipócitos. Além disso, induz diretamente a apoptose dos hepatócitos e participa do processo de ativação das células estreladas, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose hepática (Diehl et al., 2005; Farrell, Larter, 2006).

O tecido adiposo não é mais considerado um tecido inerte para reserva de energia ou de excesso de AGL; sendo altamente ativo como um órgão endócrino e originando numerosos produtos secretores ativos, chamados de adipocinas ou adipocininas. A leptina, descoberta em 1994, é sintetizada pelo tecido adiposo e surge como uma adipocina importante na fisiopatogênese da DHGNA.

A leptina é encontrada em níveis elevados na maioria dos pacientes com EHNA (Copaci et al., 2006) e parece participar do desenvolvimento da fibrose em pacientes com EHNA mediante ativação das células estreladas (Leclercq et al., 2002; Ikejima et al., 2005).

A leptina é liberada do tecido adiposo em quantidades proporcionais à massa de tecido adiposo, indicando estado de abundância energética (Baratta, 2002). Assim se aceita que a leptina tenha um paralelismo com o balanço energético: em situação de balanço energético negativo como em restrição dietética, há redução dos níveis de leptina com consequente redução de gasto energético e aumento do apetite; em situações de abundância de energia, a leptina aumenta, reduzindo o apetite e aumentando o gasto energético.

Vários estudos indicam que a maioria dos obesos têm altos níveis de leptina por serem resistentes à sua ação, por mecanismos ainda desconhecidos (Enriori et al., 2006).

Existem vários modelos animais para estudar a DHGNA e a EHNA, mas nenhum deles consegue reproduzir na realidade os componentes essenciais presentes na doença humana (Anstee; Goldin, 2006)

Entre os principais modelos destaca-se o do camundongo obeso, deficiente em leptina (ob/ob), que é portador de síndrome metabólica. Esses camundongos apresentam comportamento de animais em um estado constante de jejum, hiperfágicos, e hipometabólicos, com níveis séricos elevados de corticosterona e insulina. São hipotérmicos, e incapazes de se manterem aquecidos e com alteração de apetite, o que gera a obesidade característica, com distúrbios metabólicos similares aos dos diabéticos. Apresentam infertilidade e comprometimento no crescimento, quando desenvolvem a obesidade, resistência à insulina, e esteatose hepática

espontânea, sendo esse desenvolvimento uma das características mais fortes que favorece o uso desse animal na DHGNA. Por outro lado, este animal não desenvolve EHNA espontaneamente, necessitando de um segundo estímulo (second hit) para que a esteatose se transforme em esteatohepatite. Outros modelos como o rato fa/fa (Zucker) e o camundongo (db/db) desenvolvem resistência à insulina e obesidade pelo fato de apresentarem mutações no receptor de leptina (Koteish et al., 2002; Nanji, 2004; Anstee; Goldin, 2006).

Fatores ambientais como as dietas hipercalóricas ou deficiente em algum nutriente também são utilizadas para induzir DHGNA. A dieta deficiente em colina e metionina (DCM) já é um modelo conhecido de esteatose e de esteatohepatite em animais de pequeno porte. A colina, uma amina quaternária, é nutriente necessário para a síntese de fosfolipídeos como a esfingomielina e a fosfatidilcolina, essenciais na composição de todas as membranas celulares e de moléculas como lipoproteínas de baixíssima densidade. Há duas vias pelas quais a fosfatidilcolina pode ser sintetizada: através da incorporação direta da colina nos radicais fosfatidile e por meio da metilação da fosfatidiletanolamina pela S-adenosilmetionina.

Metionina é um aminoácido essencial não sintetizado pelo organismo, e que deve portanto, ser obtido através da alimentação. É essencial para a absorção, transporte, e biodisponibilidade de lípidos, e atua como agente lipotrófico na prevenção da formação de gordura em excesso no fígado. Numa dieta carente de colina e metionina, ambas as vias são inibidas, resultando em produção deficiente de fosfatidilcolina e prejuízo na formação de lipoproteínas de baixíssima densidade. Uma vez que os hepatócitos exportam os ácidos graxos por meio da conversão em lipoproteínas de baixa densidade, ocorre acúmulo de triglicérides nessas células (Grattalio et al., 2000; Zeisel, 2000).

Desta forma, a dieta deficiente em colina e metionina provoca inibição da secreção de lipoproteínas de baixíssima densidade. Em nosso meio, Oliveira et al.(2005), realizou modelo experimental de esteatohepatite não alcoólica induzida tanto pela dieta DCM como a dieta hiperlipídica, ambas em camundongos. Conseguiu-se com esses modelos desenvolver EHNA muito semelhante à forma humana, com balonização hepatocelular, esteatose macro/microvesicular, em zona III, infiltrado de polimorfo nuclear e satelitose.

Em nosso país já temos uma significativa parte da população obesa e diabética, e devemos começar a ficar preocupados. Uma grande parte desses pacientes são adultos jovens e por um simples erro alimentar ou de metabolismo desenvolvem tão importante doença.

Não existe até o presente momento uma medicação capaz de curar a EHNA. O uso experimental de várias drogas não demonstrou resultados conclusivos. Modelos experimentais desta doença e com semelhança desta patologia que acomete o ser humano, são necessários para estudos de procedimentos terapêuticos para seu efetivo tratamento.

1.4 OBJETIVO

Desenvolver um modelo experimental no animal de laboratório (rato) para induzir esteatose hepática e esteatohepatite não alcoólica, usando dieta deficiente em colina (DC) e hiperlipídica (DH). Este modelo poderá proporcionar um melhor entendimento para procedimentos terapêuticos futuros.

2. Materiais e Métodos

As preparações experimentais foram realizadas conforme normas publicadas pelo “US National Institute of Health-Guide for care and use of laboratory animals” (NIH Publication, nº 85-25, revisada em 1985) e aprovadas pela Comissão Ético – Científica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.1 Animais

Foram estudados ratos Sprague - Dawley machos, pesando de 300 a 350gramas, hospedados em gaiolas padrão (duas com 3 ratos e uma com 4 ratos) e recebendo água à vontade. Induziu-se esteatose hepática nos animais por meio de dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH).

Os ratos foram distribuídos por meio de tabela sequencial randomizada em dois grupos:

Grupo 1- 10 (dez) ratos alimentados com dieta deficiente em colina hiperlipídica por 4 meses

Grupo 2- 10 (dez) ratos alimentados com dieta deficiente em colina hiperlipídica por 8 meses

Após o tempo estipulado de dieta, de acordo com o grupo, os animais foram anestesiados com cloridrato de Ketamina(dose-0,1mg/kg) e Xilazina(dose-0,1mg/kg) por via intra peritoneal e em seguida sacrificados. Em seguida foi realizado a laparotomia mediana no rato seguida de hepatectomia total, sendo o fígado pesado e fotografado.

Após, retirou-se fragmentos de tecido hepático que foi fixado em formol, tamponado (pH 7,2 – 7,4) durante 24 horas e posteriormente, processado e incluído em parafina para análise histológica.

Figura 2. Anestesia do rato

Figura 3. Rato sendo pesado.

Figura4. Assepsia da parede abdominal do rato com polvidini.

Figura 5. Punção cardíaca.

Figura 6. Laparotomia demonstrando o aspecto do fígado.

Figura 7. Aspecto ventral do fígado.

Figura 8. Fígado sendo pesado

Figura 9. Fragmentos do fígado do rato para avaliação histológica.

Figura 10. Fragmentos do fígado do rato colocado em frasco com formol.

2.2 Locais dos Experimentos

Os experimentos foram realizados no laboratório (LIM 07) da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A análise histopatológica dos fragmentos de fígado foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica (LIM 14), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por um único patologista, sem identificação prévia dos dados.

2.3 Preparação e Delineamento Experimental

Foram utilizadas as dietas deficientes em colina (DC) e hiperlipídica (DH) para indução da esteatose hepática e esteatohepatite em ratos Sprague-Dawley pesando de 300 a 350 gramas

Tabela 1. Composição da Dieta hiperlipídica AIN 93 M 35%

PRODUTO	%	PESO (g)
Amido de milho	31,3192	313,190
Caseína	14	140,00
Banha de porco	32	320,00
Sacarose	10	100,00
Óleo de soja	3	30,00
Celulose	5	50,00
PréMix Mineral AIN-93M	3,5	35,00
PréMix Vit AIN 93	1	10,00
L-Cistina	0,18	1,80
TertButilHidroquinona	0,0008	0,008
Total	100	1000,00

A Dieta foi adquirida da RHOSTER industria e comércio Ltda., situada em Vargem Grande Paulista.

2.4 Avaliação da Lesão Hepatocelular- Análise Histopatológica

Imediatamente após a eutanásia dos animais, fragmentos do tecido hepático foram fixados em formol tamponado (pH 7.2-7.4) durante 24 horas e, posteriormente, processados e incluídos em parafina segundo os procedimentos padrões estabelecidos pela divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Cortes histológicos de 5 μ m foram corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE), para avaliação histopatológica, e picrossírius, para a evidenciação das fibras colágenas e estadiamento da fibrose. A avaliação histopatológica foi realizada de

acordo com os critérios estabelecidos por Kleiner et al. (2005), onde as lesões foram graduadas segundo seu índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS).

Este índice inclui apenas características da lesão ativa, sendo definido pela soma dos graus de esteatose (0 a 3), inflamação lobular (0 a 3) e balonização (0 a 2). Dessa maneira, os valores do índice NAS variam entre 0 e 8, sendo que $NAS \geq 5$ correlaciona-se com o diagnóstico de esteatohepatite não alcoólica (EHNA), enquanto $NAS < 3$ não é considerado EHNA. Por outro lado, animais com NAS entre 3 ou 4 podem ser consideradas como prováveis portadores da EHNA. O estadiamento ou “grau” da fibrose na esteatohepatite não alcoólica foi analisado nas lâminas coradas pelo picrossírius (0 a 4), segundo critérios estabelecidos por Kleiner et al. (2005) e não faz parte do índice NAS. Como o modelo experimental de EHNA em ratos apresenta um padrão heterogêneo de fibrose, o estadiamento foi realizado em relação à área mais afetada do tecido, o que não reflete necessariamente a média de cada animal. Nos quadros 1 e 2 estão descritos os critérios adotados para cada classificação e seus respectivos escores.

Tabela 2: Critérios histopatológicos do índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS)

Balonização	Escore
Ausente	0
Poucas células balonizadas	1
Muitas células balonizadas	2
Esteatose Micro/Macroglotular	Escore
< 5%	0
5 – 33 %	1
33 – 66 %	2
> 66 %	3
Inflamação Lobular	Escore
Ausência de focos	0
< 2 focos por campo (200x)	1
2-4 focos por campo (200x)	2
> 4 focos por campo (200x)	3

Fonte: (Modificado de Kleiner et al., 2005)

Tabela 3: Estadiamento da fibrose hepática na esteatohepatite não alcoólica

Fibrose	Escore
Ausente	0
Perissinusoidal ou periportal	
Leve, zona 3, perissinusoidal	1
Moderada, zona 3, perissinusoidal	
Portal / Periportal	
Perissinusoidal e Portal/Periportal	2
Fibrose em ponte	3
Cirrose	4

Fonte: (Modificado de Kleiner et al., 2005)

2.5 Análise Estatística

A comparação estatística dos parâmetros semi-quantitativos foi realizada pela análise de variância seguida da aplicação do teste t-Student, adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Matheuws; Farewell, 1988).

3. Resultados

3.1 Peso dos Animais

3.1.1 Peso dos Animais do grupo 1.

O peso dos animais do Grupo 1 (DCH – 4 meses) no início (Pi) do experimento variou de 305,0 a 350,0 gramas com média de 329,9 gramas e no fim do experimento (PfSg) variou de 529,0 a 615,0 gramas com média de 579,2g (Tabela 1)

Tabela 4 – Variação do peso corpóreo dos animais do Grupo 1 (DCH – 4) no início (Pi), no fim do experimento (PfSg) e percentual do ganho de peso dos animais

ANIMAL	Pi(g)	PfS(g)	Percentual do ganho do peso
R1 – 4	329,0	615,0	86,93
R2 – 4	315,0	529,0	67,93
R3 – 4	305,0	537,0	76,06
R4 – 4	320,0	587,5	83,59
R5 – 4	340,0	613,5	80,44
R6 – 4	330,0	584,0	76,96
R7 – 4	350,0	592,5	69,28
R8 – 4	350,0	560,0	60,00
R9 – 4	320,0	586,0	83,12
R10 – 4	340,0	588,0	72,94
MÉDIA	329,9	579,2	75,72

O percentual do ganho de peso dos animais variou de 60,00% a 86,93%, com média de 75,72%

Figura 11. Rato 4 do Grupo 1 sendo pesado. Peso inicial 320 gramas

Figura12. Rato 4 do Grupo 1. Laparotomia demonstrando o fígado.

Figura 13. Fígado do rato 4 do grupo 1 sendo pesado.

Figura 14. Aspecto ventral do fígado do rato 4 do Grupo 1.

Figura 15. Aspecto dorsal do fígado do rato 4 do grupo 1.

3.1.2 Peso dos Animais do grupo 2

O peso dos animais do Grupo 2 (DCH - 8 meses) no início do experimento (Pig) variou de 320,0 a 353,0g com média de 339,4g e no fim do experimento PfS(g) variou de 661,5g a 783,0g com média de 705,6 (Tabela 2)

Tabela 5 – Variação de peso corpóreo dos animais de Grupo 2 (DCH – 8) no início (Pi), no fim do experimento (PfS) e percentual do ganho de peso dos animais

ANIMAL	Pi (g)	PfS(g)	Percentual do ganho de peso
R1 – 8	340,0	665,0	95,58
R2 – 8	345,0	701,0	103,18
R3 – 8	350,0	783,0	123,71
R4 – 8	338,0	678,0	100,59
R5 – 8	353,0	783,0	121,81
R6 – 8	343,0	690,0	101,16
R8 – 8	325,0	689,0	112,00
R9 – 8	341,0	700,0	105,27
R10 – 8	320,0	661,5	106,71
MÉDIA	339,4	705,6	107,78

O percentual de ganho do peso dos animais variou de 95,58% a 123,71% com média de 107,78%.

Figura 16. Rato 2 do Grupo 2 sendo pesado. Peso inicial 345 gramas.

Figura 17. Rato 2 do Grupo 2. Laparotomia demonstrando o fígado.

Figura 18. Fígado do rato 2 do Grupo 2 sendo pesado.

Figura 19. Aspecto ventral do fígado do rato 2 do Grupo 2.

Figura 20. Aspecto dorsal do fígado do rato 2 do Grupo 2.

3.2 Peso do fígado dos animais

3.2.1 Peso do fígado dos animais do grupo 1

O peso do fígado dos animais do Grupo 1 por ocasião do fim do experimento e retirado no momento do sacrifício dos animais (PFS), variou de 24,5g a 29,5 com média de 27,6g (Tabela 3).

Tabela 3 – Peso do fígado dos animais do Grupo 1 por ocasião do sacrifício

ANIMAL	PFSg
R1 – 4	28,5
R2 – 4	25,0
R3 – 4	24,5
R4 – 4	28,5
R5 – 4	34,0
R6 – 4	28,3
R7 – 4	25,5
R8 – 4	29,5
R9 – 4	27,5
R10 – 4	24,5
MÉDIA	27,6

3.2.2 Peso do fígado dos animais do grupo 2

O peso do fígado dos animais do grupo 2 por ocasião do sacrifício (PFS) (fim do experimento) variou de 31g a 39g com média de 33,8g (Tabela 4).

Tabela 4 – Peso do fígado dos animais do Grupo 2 por ocasião do sacrifício (PfSg)

ANIMAL	PfSg
R1 – 8	31,0
R2 – 8	32,5
R3 – 8	39,0
R4 – 8	31,4
R5 – 8	37,0
R6 – 8	33,0
R8 – 8	32,9
R9 – 8	35,5
R10 – 8	32,0
MÉDIA	33,8

3.2.3 Percentual do peso do fígado (PFS) em relação ao peso dos animais do grupo 1

O percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do Grupo 1 variou de 4,16% a 5,54% com média de 4,75% (Tabela 5)

Tabela 5 – Percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do Grupo 1.

ANIMAL	PfSg	PFSg	Percentual do peso do fígado e do animal
R1 – 4	615,0	28,5	4,63
R2 – 4	529,0	25,0	4,72
R3 – 4	537,0	24,5	4,56
R4 – 4	587,5	28,5	4,85
R5 – 4	613,5	34,0	5,54
R6 – 4	584,0	28,3	4,84
R7 – 4	592,5	25,5	4,30
R8 – 4	560,0	29,5	5,26
R9 – 4	586,0	27,5	4,69
R10 – 4	588,0	24,5	4,16
MÉDIA			4,75

3.2.4 Percentual do peso do fígado (PFS) em relação ao peso dos animais do grupo 2

O percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do Grupo 2 variou de 4,63% a 5,07% com média de 4,78%.

Tabela 6 – Percentual do peso do fígado em relação ao peso dos animais do Grupo 2.

ANIMAL	PfSg	PFSg	Percentual do peso do fígado e do animal
R1 – 8	665,5	31,0	4,66
R2 – 8	701,0	32,5	4,63
R3 – 8	783,0	39,0	4,98
R4 – 8	678,0	31,4	4,63
R5 – 8	783,0	37,0	4,72
R6 – 8	690,0	33,0	4,78
R8 – 8	689,0	32,9	4,77
R9 – 8	700,0	35,5	5,07
R10 – 8	661,5	32,0	4,84
R7 – 8 (faleceu)			
MÉDIA			4,78

3.3 Avaliação Histológica do Fígado

3.3.1 Avaliação histopatológica dos fígados dos animais do Grupo 1

Grande parte dos animais que receberam a dieta DCH durante 4 e 8 meses apresentou intensa balonização e esteatose microgótica, com inflamação lobular (Tabela 7). No entanto, o estadiamento da fibrose foi muito discreto nestes animais (Tabela 8).

Tabela 7: Análise histopatológica dos fígados dos animais alimentados com dieta DCH durante 4 meses.

Animal	Balonização (0-2)	Esteatose (0-3)	Inflamação Lobular (0-3)	Índice NAS 5
1	1	3	1	5
2	2	3	1	6
3	2	3	1	6
4	2	3	1	6
5	2	3	2	7
6	2	3	1	6
7	2	3	2	7
8	2	3	1	6
9	2	3	1	6
10	2	3	1	6
Média	1,9	3,0	1,2	6,1

Tabela 8: Estadiamento da fibrose hepática dos animais alimentados com a DCH durante 4 meses.

Animal	Fibrose (0-4)
1	0
2	0
3	1
4	0
5	0
6	1
7	1
8	2
9	0
10	0
Média	0,5

3.3.2 Avaliação histopatológica dos fígados dos animais do Grupo 2

Grande parte dos animais que receberam a dieta DCH durante 8 meses apresentou intensa esteatose microgoticular e balonização, com inflamação lobular (Tabela 9). Alguns animais também apresentaram esteatose macrogoticular, principalmente em região centrolobular. Os animais deste grupo apresentam fibrose, com grande variação individual (Tabela 10).

Tabela 9: Análise histopatológica dos animais alimentados com dieta DCH durante 8 meses

Animal	Balonização (0-2)	Esteatose (0-3)	Inflamação Lobular (0-3)	Índice NAS 5
1	2	3	1	6
2	2	2	2	6
3	2	3	1	6
4	1	3	1	5
5	2	2	1	5
6	2	3	1	6
8	1	3	2	6
9	2	3	1	6
10	2	3	1	6
Média	1,8	2,8	1,2	5,2

Tabela 10: Estadiamento da fibrose hepática dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica durante 8 meses

Animal	Fibrose (0-4)
1	0
2	1
3	3
4	1
5	1
6	2
8	1
9	1
10	0
Média	1,1

3.3.3 Análise comparativa dos modelos de EHNA pela dieta DCH (4 meses vs. 8 meses)

Os animais de ambos os grupos experimentais desenvolveram a esteatohepatite não alcoólica, pois apresentaram o índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS) ≥ 5 . A análise comparativa demonstrou não haver diferença estatística no valor médio do NAS entre os grupos experimentais ($p = 0.597$) (Figuras 21 e 23).

Em relação ao estadiamento da fibrose na esteatohepatite não alcoólica, os animais que receberam a dieta DCH durante 8 meses apresentaram uma tendência de escores mais elevados em comparação aos animais que receberam a mesma dieta durante 4 meses. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos devido à grande variação individual ($p = 0.2755$) (Figuras 22 e 24).

Figura 21: Índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS) nos animais que receberam a dieta hiperlipídica durante 4 ou 8 meses. Não existe diferença estatística entre os grupos ($p>0.05$)

Figura 22: Estadiamento da fibrose nos animais que receberam a dieta DCH durante 4 ou 8 meses. Não existe diferença estatística entre os grupos ($p>0.05$).

Figura 23: Aspectos histopatológicos da esteatohepatite não alcoólica dos animais que receberam a dieta DCH durante 4 ou 8 meses. **(A)** Fotomicrografia do tecido hepático após 4 meses de dieta DCH. **(B)** Fotomicrografia do tecido hepático após 8 meses de dieta DCH. (*) Infiltrado inflamatório. Observa-se que não existe diferença no padrão histológico entre os grupos experimentais. **(C)** Exemplo da esteatose microgoticular nos hepatócitos (pontas de seta) dos animais tratados com a dieta DCH. (*) Infiltrado inflamatório **(D)** Exemplo de hepatócitos balonizados (setas), presentes em ambos os grupos. Coloração de hematoxilina-eosina. Barra de escala: (A-B) = 100 μm e (C-D) = 20 μm .

Figura 24: Fibrose hepática nos animais que receberam a dieta DCH durante 4 ou 8 meses. **(A)** e **(B)** Fotomicrografias do tecido hepático após 4 meses de dieta DCH. Observa-se uma maior deposição de colágeno perissinusoidal (corado em vermelho) na região centrolobular. **(B)** Padrão da fibrose perissinusoidal presente na esteatohepatite não alcoólica, representada pela deposição de fibras de colágeno ao redor de pequenos grupos de hepatócitos. **(C)** e **(D)** Fotomicrografias do tecido hepático após 8 meses de dieta DCH. É possível observar uma maior deposição de colágeno no fígado destes animais, com expansão fibrosa nos espaços vasculares e ocasional formação de pontes de colágeno. Coloração de picrosírius. Barra de escala: (A, C-D) = 100 μ m e (B) = 40 μ m.

3.3.4. Morte de um animal

Em nosso experimento um rato faleceu, o de n.º 07 do Grupo 2. Faleceu após 40 semanas de experimento. Apresentou como característica:

ANIMAL	Pig	PfSg	% DO GANHO DO PÊSO CORPOREO	PF ÓBITO g	% DO PFs E PÊSO PfS
Rato 7	305,0	394,0	29,2	22,0	5,58

Verifica – se que o percentual de ganho do peso foi muito pequeno, 29,9%, bem menor que os outros ratos de seu grupo cuja média foi 107,78%. Quanto ao percentual do peso do fígado em relação ao peso corpóreo o animal que faleceu apresentou valor de 5,58% ao passo que nos outros animais do mesmo grupo este valor teve como média 4,78%.

Figura 25. Rato 7 do Grupo 2 que faleceu, sendo pesado. Peso inicial 305 gramas.

Figura 26. Rato 7 do Grupo 2 que faleceu. Laparotomia demonstrando o fígado.

Figura 27. Fígado do rato 7 do Grupo 2 que faleceu, sendo pesado.

Figura 28. Aspecto ventral do fígado do rato 7 do Grupo 2, que faleceu.

4. Discussão

Para tornar a discussão mais didática, serão comentados cada parâmetro, de acordo com os resultados obtidos, comparando os dois grupos de animais estudados e estes com os relatos da literatura. Às vezes torna-se difícil tal pretensão, já que nos vários trabalhos publicados empregam-se metodologias, critérios de seleções e casuísticas diferentes entre si.

4.1 Característica do Animal

Quanto às características dos ratos, optamos para o presente estudo utilizar os animais da raça Sprague Dawley. Essa raça de rato foi produzida, a partir da raça Wistar, primeiramente pelas fazendas de Sprague Dawley em Madison, Wisconsin, para mais tarde se transformar no Sprague Dawley Animal companhia, em 1980. Tem sido uma raça bastante utilizada principalmente pela calma, docilidade e facilidade de manipulação, além de características anatômicas interessantes, como no caso do esôfago, que entra no estômago em pouca curvatura através de uma dobra do tecido do estômago, tornado esses animais incapazes de vomitar.

4.2 Peso do Animal

Na tentativa de caracterizar o estado físico nutricional de um animal, o peso corpóreo é largamente usado como primeiro critério. Tabelas padrão são úteis para dar o peso “ideal” (normal) para o indivíduo, de acordo com sexo, altura e idade.

A maioria, se não todas as tabelas para adultos citados em livros textos americanos, frequentemente sem indicar a fonte original de informação, tem como modelo original a “Medico – actuarial Mortality Investigation”, de 1992 (Brozek; Keys, 1950). Estas tabelas indicam que o peso corpóreo pode continuar a aumentar, mesmo depois que o crescimento em altura se completou.

Casillos e Vargas (1980) discutem as diferentes técnicas de se obter informações sobre o estado nutricional dos indivíduos e observam que o mais importante é a determinação de peso e altura e cálculo de índice de massa corpórea.

Os ratos que receberam a dieta DCM, modelo clássico de DHGNA, apresentaram perda significativa de peso ao final de 90 dias, com achados de desnutrição. Ao contrário, o grupo que recebeu ração apresentou ganho de peso (Zamin Jr., ET AL., 2009).

No nosso trabalho o peso dos animais do Grupo 1 no início do experimento variou de 305,0 g a 350,0 gramas tendo como média 329,9 gramas. No fim do experimento o peso corpóreo variou de 529,0 g a 613,5 g, com média de 579,2 gramas.

O percentual médio do ganho de peso corpóreo dos animais do Grupo 1 foi de 75,72%, do início do experimento até a data do sacrifício dos animais. Nos animais do grupo 2 o peso corpóreo no início do experimento variou de 320,0g a 353,0 gramas com média de 339,4 gramas e no fim do experimento variou de 661,5 gramas a 783,0 gramas com média de 705,6 gramas com percentual médio de ganho de peso de 107,78%

4.3 Peso do Fígado

Em vez de considerar os pesos absolutos dos fígados (PF), alguns autores preferem estabelecer relações entre o PF e do indivíduo, ou outros índices antropométricos.

Kaplan e Chaikoff (1935) assinalaram que, em cães, a relação percentual entre o PF e o peso corpóreo variava de 1,9 a 2,8%. Parra, em 1988 verificou em sua Tese de Doutorado que o peso do fígado do rato Wister representava em média

3,3% do peso do animal.

Em humanos, os valores percentuais do PF em relação ao peso indivíduo, apontados na literatura, variam segundo os diversos autores. Drennan, em 1951 (Raso; Siqueira, 1963) consideraram o PF normal como 1/50 ou 2% do peso do indivíduo adulto. Já Ludwig e Elveback (1972), em seus estudos sobre variações do peso do fígado cirrótico, consideraram que o PF corresponde a 1/30 ou 2,5% do peso corpóreo do adulto.

Valores mais altos como 1/36 ou 2,8% são considerados por Nimeh (1955) e Symington (Raso; Siqueira, 1963). Rosa, CS, constatou que a relação percentual entre PF e o peso corpóreo variou de 1,9% até valores máximos de 3,9%.

Em nosso trabalho constatamos que a relação percentual entre o peso do fígado e o peso corpóreo dos ratos que receberam DCH – 4 variou de 4,16 a 5,54% com média de 4,75% e os que receberam DCH – 8 variou de 4,63 a 5,07% com média de 4,78%.

4.4 Modelos Experimentais

Várias dietas tem sido usadas em animais de laboratório, principalmente camundongos e ratos no sentido de induzir esteatose, esteatohepatite e fibrose hepática, embora nenhuma delas consiga reproduzir na totalidade os componentes essenciais da doença humana.

Em camundongos a dieta deficiente em leptina leva a esteatose que progride para EHNA sem fibrose (aumenta a importação e síntese de lipídios), Ansteen e Goldim, 2006.

A dieta com alto teor de gordura leva o animal à adiposidade, com aumento da resistência à insulina, com a presença de esteatose e esteatohepatite sem fibrose. A dieta com alto teor de sacarose e frutose leva à esteatose, sem fibrose.

A dieta deficiente em arginina leva ao aumento de síntese de ácidos graxos e esteatose, sem fibrose.

A dieta com esteróide tamoxifen leva a disfunção na β oxidação mitocondrial, diminuição na exportação de triglicérides e esteatose, sem fibrose. Não encontramos em nenhum trabalho de literatura a utilização da dieta deficiente em colina e hiperlipídica (DCH), por nós utilizada. Lima (2007), em sua dissertação de mestrado utilizou a dieta deficiente em colina e metionina (DCM) ou hiperlipídica (DH) em camundongos, e, estes desenvolveram EHNA com esteatose macro e microvascular, balonização hepatocelular e infiltrado lobular misto.

Provavelmente, mecanismos diferentes devem estar envolvidos na gênese de EHNA nestes dois modelos. A dieta DCM pode alterar o sinal transmembrana e o transporte de ácidos graxos dentro do hepatócito, reduzindo a exportação dos triglicérides sob a forma de VLDL, tendo como consequência acúmulo de gordura nos hepatócitos (Ilkura et al., 2006). Já a dieta hiperlipídica, exacerba o aumento da resistência insulínica, situação já presente nestes camundongos obesos, aumentando a síntese de ácidos graxos e o influxo destes para os hepatócitos (Antee; Godin, 2006).

Baseando-se na teoria dos dois “hits”, observamos nestes modelos que o primeiro estímulo foi caracterizado pelo acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, que suplantou sua capacidade de metabolização e exportação, resultando no aumento excessivo da quantidade de ácidos graxos para o fígado, favorecendo a infiltração gordurosa hepática (McCullough et al., 2006). Por outro lado o excesso de ácidos graxos nos hepatócitos estimula a oxidação mitocondrial, aumentando a geração de EROS (Oliveira et al., 2006), segundo estímulo para o desenvolvimento de inflamação e fibrose.

Vários estudos têm demonstrado que as EROS estão aumentadas na EHNA,

enquanto os níveis de antioxidantes (vitamina E e glutathione) estão diminuídos (Chitturi; Farrell, 2001; Grattalano et. al., 2000).

A dieta DCM é um modelo clássico de DHGNA, na qual os animais desenvolvem esteatose macro vesicular e esteatose hepática sem fibrose.

A dieta por nós utilizada (DCH) mostrou ser um modelo para desenvolver DHGNA, na qual os animais desenvolvem esteatose macro e micro, esteatohepatite e fibrose hepática.

4.5 Avaliação Histológica do Fígado

Em relação ao exame macroscópico dos fígados os animais que receberam a DCH – 4 apresentaram fígado aumentado de tamanho, com coloração esbranquiçada. Nos animais que receberam DCH – 8 também foram observadas áreas amareladas de depósito de gorduras.

No experimento realizado por ZAMIN Jr ET AL., 2009 utilizando DCM, em relação aos achados histológicos, nenhum dos 10 ratos que receberam a ração apresentou alterações histológicas, sendo considerado como tendo fígado normal. Dentre os 39 ratos que receberam dieta DCM todos apresentaram pelo menos algum grau de esteatose macrovesicular, que sempre foi predominante em relação a microvesicular. O diagnóstico de esteatohepatite não alcoólica foi realizado em 27 (70%) dos 39 ratos que receberam a dieta DMC. Em relação à atividade inflamatória esta esteve ausente em 12 ratos, sendo que 13 ratos apresentaram grau 1, 8 ratos grau 2 e outros 6 animais grau 3. Em relação a fibrose foi considerado estágio 1 em 13 ratos e 1 rato apresentou cirrose.

A dieta utilizada por nós, DCH, na avaliação histológica, grande parte dos animais que receberam DCH – 4 apresentou intensa balonização e esteatose

microgoticular, com inflamação lobular; no entanto o estadiamento de fibrose foi muito discreto nesses animais.

Grande parte dos animais que receberam DCH – 8 apresentou intensa esteatose microgoticular e balonização com inflamação lobular. Alguns animais também apresentaram esteatose macrogoticular, principalmente em região centrolobular; os animais deste grupo apresentaram fibrose com grande variação individual.

A utilização de modelos animais com EHNA é muito importante no estudo desta doença, pois pode permitir melhor entendimento de sua fisiopatologia, ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na transição da esteatose para a EHNA, bem como testar o resultado das várias drogas disponíveis para o seu tratamento. A indução de EHNA tem sido realizada de diferentes maneiras: por indução medicamentosa (tetraciclina, amiodarona, corticosteróides, entre outros); com a utilização de ratos geneticamente obesos ou com manipulação genética e com a utilização de dietas que promovem a sua recorrência, seja por serem ricas em gorduras, seja por restrição de aminoácidos.

As drogas podem induzir esteatose e EHNA ao inibir a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, como ocorre com a amiodarona, as tetraciclina e os corticosteróides, entre outros, ou também, ao bloquear a liberação de triacilgliceróis do fígado proporcionando consequentemente, o seu acúmulo, como ocorre, por exemplo, com o ácido valpróico.

Os modelos genéticos de EHNA utilizam animais que possuem alguma mutação espontânea que promovem a doença ou linhagem de animais geneticamente modificadas em laboratório, que desenvolverão EHNA.

Os ratos ob/ob são os principais exemplo de animais que apresentam mutação espontânea que bloqueia a produção de leptina. À semelhança dos

humanos, estes animais apresentam hiperinsulinemia (resistência à insulina), hiperglicemia e dislipidemia, e desenvolvem esteatose. Na deficiência de leptina, ocorre importante esteatose, porém a esteatohepatite somente ocorre se houver outro estímulo hepatotóxico como, por exemplo, o uso de alguma droga ou a indução de isquemia.

A outra linhagem de ratos geneticamente obesos são os fa/fa, que desenvolvem mutação espontânea no gene de receptor da leptina. Desta forma, apesar de produzirem o hormônio, apresentam resistência periférica ao mesmo, com efeito final semelhante ao que ocorre com os ratos ob/ob, porém sem responder à administração exógena de leptina.

Em laboratório de genética, consegue-se realizar modificações gênicas e a produção de linhagens de animais que desenvolvem esteatose. Existem várias intervenções que podem ser realizadas em genes diferentes com objetivo semelhante, ou seja, gerar desequilíbrio na homeostasia dos lipídios, de forma que ocorra a formação de esteatose. Uma das principais modificações genéticas utilizadas nesses modelos é a ativação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e colesterol, promovendo a lipogênese e a deposição de gordura no fígado. Tanto os ratos com mutação natural que induz a esteatose e a EHNA, como aqueles geneticamente modificados, são excelentes modelos experimentais para o estudo desta doença e são utilizados, rotineiramente, com tal propósito em pesquisas. Tratam-se, porém, de modelos onerosos, pela dificuldade de aquisição de linhagens com mutação espontânea ou pela necessidade de técnicas sofisticadas realizadas em laboratório de biologia molecular, pouco disponível em nosso meio. Desta forma, torna-se difícil a utilização desses modelos na maioria das pesquisas. A indução de EHNA também é possível em modelos animais através de manipulação da dieta, de forma a promover a deposição de lipídios no fígado.

Nesse sentido, podem-se utilizar dietas que promovam a obesidade e a esteatose ou dietas que induzem somente a deposição de gordura hepática, sem a ocorrência de obesidade.

Como a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) está fortemente associada à obesidade, alguns estudos em modelos experimentais a induzem e, dessa forma, esperam a ocorrência posterior de esteatose e EHNA. Entretanto, à semelhança dos seres humanos, os ratos apresentam respostas e suscetibilidade diferente à dieta, sendo que tanto a ocorrência de obesidade como posteriormente a DHGNA, dependem de outros fatores, como idade, gênero e predisposição genética. Dentre as diversas dietas com este propósito, aquelas com elevadas quantidades de lipídios ou glicídios são as mais utilizadas.

O presente estudo comprovou que a utilização de dieta DCH é eficaz e se destaca entre várias maneiras de induzir EHNA em modelos animais, pelo baixo custo e pelo fato de poder ser facilmente usado em laboratório. Assim fica sugerido este modelo como padrão para os estudos de EHNA, uma vez que apresenta baixo custo e elevada eficácia.

5. Conclusões

- 1- A Dieta DCH administrada por 4 e 8 meses induziu nos ratos aumento considerável do peso corpóreo.
- 2- A Dieta DCH administrada por 4 e 8 meses induziu nos ratos aumento considerável do peso do fígado.
- 3- Grande parte dos animais que receberam a dieta DCH durante 4 meses apresentou intensa balonização e esteatose microgoticular, com inflamação lobular.

No entanto, o estadiamento da fibrose foi muito discreta nestes animais.

- 4- Grande parte dos animais que receberam a dieta DCH durante 8 meses apresentou esteatose macrogoticular e balonização, com inflamação lobular.

Alguns animais também apresentaram esteatose macrogoticular, principalmente em região centro lobular. Os animais deste grupo apresentaram fibrose com grande variação individual.

Desta forma, a dieta DCH, induz no rato esteatose e esteatohepatite com fibrose, servindo de modelo para proporcionar um melhor entendimento para procedimentos terapêuticos futuros desta importante patologia do fígado.

6. Referências

1. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease steatohepatitis research. *Int.J.Exp.Pathol.* 2006;87(1)1-16.
2. Baratta M. Leptin- from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med Sci Monit.* 2002;8(12):RA282-92.
3. Brozek J, Keys A, Henschel A, et al (eds). *Comportaments of the Body. In the Biology of human Starvation* U of minn Pr, Mineapolis. 1950; 273-85
4. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.
5. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis: *Hepatol Res.* 2005;33(2):68-71.
6. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: Clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology.* 1999;29(3):664-9.
7. Casillas Let Vargas La. Tablas de peso y talla para adultes mexicanos. *Arch. Invents. Clin.* 1980; 11(1); 157-74
8. Clark JM, Brancat FI, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002; 122:1649-1657
9. Copaci I, Micu L, Voiculescu M. The role of cytokines in non-alcoholic steatohepatitis a systematic review. *J. Gastrointestin Liver Dis.* 2006;(15):363-373.
10. Cotrim HP, De Freitas LA, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F, Paraná R, Jesus RS, Andrade Z. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemical with or without associated metabolic conditions. *Liver int.* 2004;24(2):131-5.
11. Das UN. Metabolic syndrome X an inflammatory condition? (Review). *Exp Biol Med(Maywood).* 2002;227(11):989-97.
12. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? *Gastroenterology.*

- 1998;114(4):842-5.
13. Diehl AM, Li ZP, Lin HZ, Yang SQ. Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *GUT*. 2005;54:303-306.
 14. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001;121:91-100.
 15. Duncan BB, Schmidt MI, Chambless LE, Folsom AR, Carpenter M, Heiss G. Fibrogen, other putative markers of inflammation, and weight gain in middle-aged adults - The ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities. *Obes Res*. 2000;8(4):279-86.
 16. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity(Silver Spring)*. 2006;Suppl5:254S-258S.
 17. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Seminars in Liver Dis*. 2001;21(1):17-26.
 18. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2Suppl1):S99-S112.
 19. Fonseca JCF. Esteatohepatite- A doença do milênio. *Imprensa Amazonense* 2006.
 20. Gholam PM, Kotler DP, Flancbaum LJ. Liver pathology in morbidly obese patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg*. 2002;12(1):49-51.
 21. Grattalano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicalli M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr*. 2000;130(9):2131-6.
 22. Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2005;(33):151-4.
 23. Ikura Y, Olsawa M, Loxkane T, Fukushima H, Itabe H, Jomura H, Nishiguchi S, Ueda M. Localization of oxidized phosphatidylcholine in Nonalcoholic fatty

- liver disease: Impact on disease progression. *Hepatology* 2006; 43: 506 - 14
24. Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med.* 2005; 22(9):1141-5.
 25. Kaplan A and Chaikoff IL. The effect of raw and autoclaved pancreas lipids of the completely depancreatized dog maintained with insulin. *J. Biol. Chem.* 1935; 12:155-65
 26. King LS, Meehan MC. A history of the history of the autopsy. *Am J Pathol.* 1973;73:514-544.
 27. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1313-21.
 28. Koteish A, Diehl AM. Animals models of steatohepatitis Best Pract. *Res Clin Gastroenterol.* 2002;16(5):679-90.
 29. Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol.* 2002;37:206-13.
 30. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2461-8.
 31. Leevy CM. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and review of the literature. *Medicine(Baltimore).* 1962;41:249-276.
 32. Lima, VMR. Esteato hepatite não alcoólica em camundongos obesos (ob/ob): avaliação do efeito citoprotetor do Yo Jyo Hen Shi Ko (YHK) Dissertação de Mestrado – FMUSP, 2007
 33. Ludwig J, Elveback LR. Parenchyma weight changes in hepatic cirrhosis: a morphometric study and discussion of the method. *Lab Invest.* 1972; 26(3); 338-43

34. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55:434-8.
35. Madan K, Bhardway MSC, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). 2006;40(10):930-5.
36. Mathews D.E, Farewell. V.T. Using and understanding medical statistics. 2 ed. London, Karger. 1988, 20-38.
37. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3Suppl1):S17-29.
38. Nanji AA. Animal Models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2004;8(3):559-74.
39. Oliveira CP, da Costa Gayotto LC, Tatai C, Della Bina BI, Janiszewski M, Lima ES, Abdalla DS, Lopasso FP, Laurindo FR, Laudanna AA. Oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, in rats fed with a choline-deficient diet. *J Cell Mol Med.* 2002;6(3):399-406.
40. Oliveira CP, Faintuch J, Rascovski A, Furuya CK jr, Bastos Mdo S, Matsuda M, Della Nina BI, Yahnosi K, Abdala DS, Vezozzo DC, Alves VA, Zilberstein B, Garrido AB jr, Halpern A, Carrilho FJ, Gama-Rodrigues JJ. Lipid peroxidation in bariatric candidates with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)- preliminary findings. *Obes Surg.* 2005;15(4):502-5.
41. Oliveira CP, Coelho AM, Barbeiro Hv, Lima VMR, Lorian F, Ribeiro C, Molan NA, Alves VA, Souza Hp, Machado MC, Carrilho FJ. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz Biol. Res.* 2006; 39(2):189-94
42. PARRA, OM. Efeitos da Ciclosporina sobre a Regeneração Hepática: Estudo Experimental. Tese de Doutorado, FMUSP, 1988
43. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* .1990;11(1):74-80.

44. Raso P, Siqueira J. The weight of the normal liver in adult Brazilians Hospital (Rio J). 1963 Apr; 791-801, 1963
45. Rex A, Voigt JP, Gustedt C, Beckett S. The social interaction test is a valuable behavioural model for testing anxiolytic drugs in rodents, quantifying the level of social behavioural between pairs rats. *Psychopharmacology*. 2004; 177 (1-2): 23-34
46. Rosa, CS. Avaliação morfométrica da esteatose hepática em adultos normais; relações com peso e volume do fígado e com medidas antropométricas simples. Dissertação de Mestrado FMUSP 1985
47. Saviano MC, Brunetti F, Rubino A, Franzese EA, Vajro P, Argenziano A, Puziello A, Iannucci MP. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci* .1997;42(7):1428-32.
48. Stumvoll M. Thiazolidinediones - some recent developments. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12(7):1179-87.
49. Thannhauser SJ, Benotti J, Walcott A. Biochemistry of the sphingolipids. *J Biol Chem*. 1942;13-14.
50. Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson H, Trush MA, Diehl AM. Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;378(2):259-68.
51. Zamin Jr I, Mattos A A, Mattos A Z, Migon E, Soares E, Perry M L S. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arq. Gastroenterology*. 2009; 46(1): 69-74
52. Zeisel SH. Choline: An essential nutrient for humans. *Nutrition*. 2000; 16:7-8.