

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM  
GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ASPARTATO DE ORNITINA E VITAMINA E  
NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM  
MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS

Laura Bainy Rodrigues de Freitas

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Brasil

2020

Laura Bainy Rodrigues de Freitas

O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ASPARTATO DE ORNITINA E VITAMINA E  
NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUOSA NÃO-ALCOÓLICA EM  
MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação:  
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Porto Alegre, Brasil

2022

CIP

CIP - Catalogação na Publicação

de Freitas, Laura

O EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ASPARTATO DE ORNITINA E VITAMINA E NO TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS / Laura de Freitas. -- 2020.

98 f.

Orientador: Mario Reis Alvares-da-Silva.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. DHGNA. 2. . I. Reis Alvares-da-Silva, Mario, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“Não deixemos passar despercebido o outro grande fato de que a ciência não apenas constitui a base da escultura, da pintura, da música e da poesia, mas de que ela própria é poética. É frequente aqueles que se dedicam a pesquisas científicas nos mostrarem que percebem não menos vividamente, mas de maneira mais vívida que outros, a poesia de seus temas”*

*Herbert Spencer*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família pelo carinho, apoio e incentivo para poder realizar meus sonhos. Ao Pedro Vieira que sempre esteve presente para me incentivar e superar as dificuldades. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Agradeço ao Professor Doutor Mário Reis Álvares-da-Silva, meu orientador, que me incentivou a continuar na pesquisa, acreditou no meu potencial, incentivou e teve paciência necessária. Meu muito obrigada por tudo.

Agradeço à Professora Ivana Grivicich por me apresentar a pesquisa e nunca ter me deixado desistir de seguir na área. Se não fosse os cinco anos como tua aluna, não teria chegado até aqui.

Agradeço à Professora Doutora Larisse Longo, amiga e companheira de pesquisa, por toda paciência, parceria e acima de tudo pela amizade. Espero que continuemos juntas nesta caminhada. Muito obrigada por tudo.

Agradeço ao Matheus, Gabriel e à Samantha pelo apoio, risadas, convívio e amizade nestes anos. Não teria chegado inteira até aqui se não houvesse a amizade de vocês.

Agradeço às amigas da faculdade que me deram apoio nos momentos de maior dificuldade e que, apesar de não entenderem a minha motivação na pesquisa, nunca deixaram de acreditar em mim.

Agradeço ao grupo de Iniciação Científica - Luiza Behrens, Matheus, Valessa, Giuliana, Carlos, Eduardo, Guilherme, Luiza Leohardt – por terem encarado 7 meses de projeto e mais muitos meses de análise de amostras. Obrigada por acreditarem no projeto e por irem até o fim. Sem vocês este estudo não teria acontecido.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo constante aprendizado e incentivo.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por acreditar na pesquisa e proporcionar o desenvolvimento deste estudo. Aos profissionais do Centro de Pesquisa Experimental, toda equipe da Unidade de Experimentação Animal, à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, ao Laboratório de Patologia Experimental, meu carinho e reconhecimento.

Agradeço ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

Agradeço à Biolab Sanus Farmacêutica por acreditarem e incentivarem a pesquisa a nível internacional. Obrigada pelo apoio financeiro para que este estudo fosse possível.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE QUADROS .....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica.....	13
2.2 A Fisiopatologia da Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica .....	15
2.3 Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica .....	20
2.4 MicroRNAs na Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica.....	22
2.5 Risco Cardiovascular e Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica .....	24
2.6 Tratamento da Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica .....	26
2.7 Aspartato de Ornitina .....	29
2.8 Modelos Experimentais .....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4. QUESTÃO DE PESQUISA.....	37
5. HIPÓTESE.....	38

6. OBJETIVOS .....	39
6.1 Objetivo Geral.....	39
6.2 Objetivos Específicos.....	39
7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	42
8. CONCLUSÕES.....	68
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75



## RESUMO

**Introdução:** A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a doença hepática crônica cuja incidência mais cresce em todo o mundo devido à sua associação com obesidade e síndrome metabólica. Embora pioglitazona e Vitamina E (VitE) possam ser recomendadas em populações selecionadas, seu tratamento específico ainda não está bem estabelecido e alternativas têm sido estudadas. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da associação de aspartato de ornitina (LOLA) e VitE em modelo animal de DHGNA. **Métodos:** Ratos Sprague Dawley machos (n=40) receberam dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC) ou ração habitual (n=10) por 28 semanas. A partir da 16ª semana foram administrados, durante 12 semanas, por gavagem, água destilada esterilizada (grupo DHGNA, n=10, grupo controle, n=10), aspartato de ornitina (LOLA; n=10), vitamina E (VitE; n=10) ou a associação de aspartato de ornitina com vitamina E (LOLA+VitE; n=10). Na eutanásia foram coletadas amostras de sangue, tecido hepático, intestinal, cardíaco, gordura epicárdica e fezes. **Resultados:** Ao final, os animais dos grupos intervenção apresentaram maior variação do peso desde o início do estudo, e aumento da circunferência abdominal, tecido adiposo visceral e peso do fígado fresco em relação ao controle ( $p < 0,001$  para todos), sem que houvesse diferença entre eles. Os níveis de AST e glicemia foram significativamente maiores ( $p < 0,001$  e  $p < 0,003$  respectivamente) no grupo DHGNA e não diferiram entre os demais. Em relação aos demais grupos que receberam DHDC, a associação LOLA+VitE reduziu os níveis de colesterol total ( $p < 0,024$ ) e aumentou os níveis de HDL colesterol ( $p < 0,001$ ), e os níveis de triglicerídeos foram menores com LOLA e LOLA+VitE em relação aos demais grupos ( $p < 0,004$ ). Em relação aos marcadores inflamatórios hepáticos, os animais que receberam LOLA tiveram níveis de IL 10 similares ao CON e maiores que

os demais grupos ( $p < 0,002$ ). Os animais que receberam LOLA+VitE expressaram menos Myd88 que os controles ( $p < 0,001$ ), e Tlr4 e Myd88 foram inferiores no grupo VitE em relação ao grupo DHGNA ( $p < 0,009$  e  $< 0,001$ , respectivamente). Houve indução de DHGNA em todos os animais dos grupos intervenção. Balonização hepatocitária esteve presente em 60% dos animais do grupo DHGNA, 50% dos grupos LOLA e VitE e em 20% dos tratados com LOLA+VitE, e fibrose hepática, em 60% do grupo DHGNA, 40% dos grupos LOLA e VitE e 20% do grupo LOLA+VitE. As medianas da quantificação da fibrose hepática em unidades de luminescência relativa foram 0,40 (0,12-0,69), 1,16 (0,48-1,66), 0,28 (0,20-0,85), 0,96 (0,12-1,38) e 0,62 (0,13-0,98) nos grupos CON, DHGNA, LOLA, VitE e LOLA+VitE, respectivamente ( $p < 0,003$ ). O peso da gordura epicárdica foi menor nos animais controles que nos demais. Em relação aos índices aterogênicos (índice de Casteli-II e coeficiente aterogênico), a associação LOLA+VitE apresentou níveis similares ao grupo CON e inferiores aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os grupos na expressão dos marcadores de permeabilidade intestinal. **Conclusões:** A associação LOLA+VitE correlacionou-se com menor lesão hepática e foi mais eficaz na correção da dislipidemia associada à DHGNA e na redução do risco cardiovascular aferido pelos índices aterogênicos que LOLA e VitE isoladamente.

**Palavras chave:** DHGNA, risco cardiovascular, fibrose hepática, LOLA, Vitamina E, permeabilidade intestinal

## ABSTRACT

**Introduction:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the chronic liver disease with the faster growing incidence worldwide due to its association with obesity and metabolic syndrome. Although pioglitazone and Vitamin E (VitE) may be recommended in selected patients, its specific treatment is not yet well established, and alternatives have been studied. The aim of this study is to evaluate the effect of the association of ornithine aspartate (LOLA) and VitE in an animal model of NAFLD.

**Methods:** Male Sprague Dawley rats (n = 40) received a choline-deficient hyperlipid diet (CDHD) or standard diet (n = 10) for 28 weeks. From the 16th week onwards, sterile distilled water (NAFLD group, n= 10; controls - CON, n = 10) was administered through gavage, LOLA (n= 10), VitE (n= 10) or LOLA+VitE (n= 10). Blood, liver, intestine, heart, epicardial fat and feces samples were collected after euthanasia.

**Results:** Animals in the intervention groups showed greater weight variation from baseline, and also higher waist circumference, visceral adipose tissue and fresh liver weight compared to the controls (p <0.001 for all), without any difference between them. AST and glycemia were significantly higher (p <0.001 and p 0.003 respectively) in the NAFLD group and did not differ among the others. LOLA+VitE decreased total cholesterol (p 0.024) and increased HDL cholesterol (p <0.001) in comparison to CDHD groups. Triglycerides were lower with LOLA and LOLA + VitE compared to the other groups (p 0.004). Regarding liver inflammatory markers, the animals that received LOLA had *IL 10* similar to the CON and higher than the other groups (p 0.002). Also, they expressed less *Myd88* than the controls (p <0.001). *Tlr4* and *Myd88* were lower in the VitE group compared to NAFLD animals (p 0.009 and <0.001, respectively). NAFLD was induced in all animals in the intervention groups. Hepatocyte ballooning was present in 60% of the NAFLD animals, 50% in those who received

LOLA or VitE and 20% of those treated with LOLA+VitE; liver fibrosis was present in 60% of the NAFLD animals, 40% LOLA or VitE groups, and 20% in LOLA+VitE animals. The medians of quantification of hepatic fibrosis in units of relative luminescence were 0.40 (0.12-0.69), 1.16 (0.48-1.66), 0.28 (0.20-0.85 ), 0.96 (0.12-1.38) and 0.62 (0.13-0.98) in CON, NAFLD, LOLA, VitE and LOLA+VitE groups, respectively (p 0.003). The weight of epicardial fat was lower in CON than in the others. Regarding atherogenic indices (Casteli-II index and atherogenic coefficient), results with LOLA+VitE were similar to CON and lower than the others (p <0.001). There was no difference between groups in the expression of intestinal permeability markers.

**Conclusions:** LOLA+VitE correlated with less severe liver damage and was more effective in correcting NAFLD-associated dyslipidemia and in reducing the cardiovascular risk through atherogenic indexes than LOLA or VitE alone.

**Key words:** NAFLD, cardiovascular risk, liver fibrosis, LOLA, VitE, intestinal permeability

## LISTA DE ABREVIATURA

ACC: Acetil-Coenzima A Carboxilase

ADMA: Dimetilarginina Assimétrica

AGE: Produtos Finais da Glicação Avançada

AGL: Ácidos Graxos Livres

A-KG: Ácido Alfaacetoglutárico

ApoB: Apolipoproteína B

ASL: Argininosuccinato Liase

ASS: Argininosuccinato Sintase

CCR1: Receptor 1 da Quimiocina C-C

CCR5: Receptor 5 da Quimiocina C-C

CHC: Carcinoma Hepatocelular

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

DNL: Lipogênese *de novo*

EHNA: Esteato-hepatite Não-Alcoólica

FGF21: Fator de Crescimento 21

FGF19: Fator de Crescimento 19

GLP1: Peptídeo semelhante ao Glucagon-1

GS: Glutamino Sintetase

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

HSD17B13: do inglês *Hydroxysteroid Dehydrogenase 17beta 13*

ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular

IL-1: Interleucina 1

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1-beta

IL-6: Interleucina 6

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LOLA: Aspartato de Ornitina

LPS: Lipopolissacarídeos

MARC1: do inglês *Mitochondrial Ami-Doxime Reducing Component 1*

MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Amônio

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

OCA: Ácido Obeticolico

ODC: Ornitina Descarboxilase

OTC: Ornitina Transcarbamilase

PAI-1: Inibidor do Ativador de Plasminogênio

PCR: Proteína C Reativa

PNPLA3: do inglês *Patatin-Like Phospholipase-3*

PPAR- $\alpha$ : Proliferadores Peroxissomais Tipo Alfa

RCV: Risco Cardiovascular

RI: Resistencia Insulínica

ROS: Radicais Livres

SGLT2: Cotransportador de Sódio-Glicose-2

SM: Síndrome Metabólica

TGF- $\beta$ : Fator de Transformação do Crescimento

THR- $\beta$ : Receptor Beta do Hormônio da Tireoide

TM6SF: do inglês *Transmembrane 6 Superfamily 2 Human Gene*

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VAP-1: Proteína de Adesão Celular Vascular

VDLD: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VitE: Vitamina E

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Histologia hepática na evolução da DHGNA

Figura 2 – Fisiopatologia da DHGNA

Figura 3 - Fatores em comum entre DHGNA e a doença cardiovascular

Figura 4 - Medicamentos em estudo para tratamento da DHGNA

Figura 5 - Ação do LOLA no metabolismo da amônia

Figura 6 - Metabolismo da L-Arginina



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Critérios diagnósticos para Síndrome Metabólica segundo o National Cholesterol Education Program's Adult

## 1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) engloba um espectro de doenças que vão da deposição de gordura nos hepatócitos à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (CHC). (1) Na história da doença hepática, a infecção pelo vírus C, infecção pelo vírus B e o álcool foram as etiologias mais frequentemente encontradas. (2) Entretanto, com o recente avanço no tratamento das hepatites virais, em especial da hepatite C, associado ao aumento da obesidade e outros distúrbios metabólicos, está havendo mudanças no perfil de pacientes com doença hepática crônica. (2) Entre essas mudanças está o surgimento da DHGNA como uma importante etiologia no processo de dano hepático, e dados recentes sugerem até 2030 deve ocorrer significativo aumento nos casos de cirrose descompensada, CHC e morte hepática relacionados à ela. (3) Os países industrializados são os que possuem maior prevalência de DHGNA e os pacientes são em sua maioria adultos que consomem dieta ocidental rica em carboidratos, gorduras e açúcares além de possuírem outras comorbidades como hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade e resistência insulínica (RI), assinalando a presença de síndrome metabólica (SM). (4)

A fisiopatologia da DHGNA não está bem esclarecida, no entanto a principal teoria aceita, a teoria dos “múltiplos golpes”, resume a doença em acúmulo de triglicerídeos que associado à presença de critérios de SM promovem o estresse oxidativo e desencadeiam uma cascata de citocinas pró-inflamatórias que leva à progressão da fibrose, desbalanço no sistema antioxidante, aumento de risco cardiovascular, disbiose intestinal, estado pró-trombótico, com possível acúmulo de amônia e aumento da circulação de radicais livres. (5) A principal causa de óbito

nestes pacientes é a doença cardiovascular (DCV) e isto pode ser explicado pelo fato de que os fatores de risco para ambas condições clínicas, DHGNA e DCV, sejam os mesmos. (6) Adicionalmente ao estado pró-inflamatório e pró-trombótico, a redução de óxido nítrico que ocorre em pacientes com DHGNA favorece a formação de placas ateroscleróticas e o fornecimento deficitário de sangue para o tecido cardíaco. (7,8)

Ainda não há um tratamento farmacológico específico aprovado para o controle da DHGNA. (4) A principal medida é a mudança de estilo de vida, com redução superior a 10% do peso corporal e programa de exercícios físicos. (4,9) No entanto, menos de 15% dos pacientes alcançam as metas propostas em seu tratamento. (2,4) As recomendações das principais sociedades para o estudo do fígado em todo o mundo são o uso de pioglitazona e/ou Vitamina E (VitE) em casos selecionados. (10–12) Contudo, se os resultados dessas drogas tradicionais são significativos na redução da esteatose e inflamação, elas não têm efeito expressivo na fibrose, que é o principal indicador de morte na doença.(11,13) A VitE é um antioxidante capaz de reduzir citocinas inflamatórias e estas moléculas podem carrear partículas de colesterol LDL tornando-as mais resistentes ao processo de oxidação, com consequente redução na produção de radicais livres. (14,15) A pioglitazona é um hipoglicemiante do grupo das tiazolidinedionas que é útil no tratamento da DHGNA, mas está relacionada a aumento de peso e osteopenia.(16,17) Embora uma série de estudos estejam sendo feitos com diferentes drogas, como ácido obeticólico, elafibranor, ceniciviroc, resmetirom, aramchol, tropifexor e, ainda, testando novas combinações, é esperado que tenhamos esquemas terapêuticos aprovados pelas agências regulatórias apenas no final desta década, o que abre espaço para estratégias alternativas. (18–20) Neste sentido, estudos com antioxidantes, probióticos e ácidos biliares, entre outros, podem ser úteis. (21) Aspartato de ornitina

(LOLA) é uma droga utilizada no tratamento da encefalopatia hepática, e, recentemente, Butterworth & Canbay sugeriram que seu efeito não se restringe à redução da amônia circulante, mas também ao aumento da produção de óxido nítrico hepático, síntese de substâncias antioxidantes e normalização do perfil lipídico e melhora da circulação arterial. (22) Os autores relataram que o uso de LOLA pode estar relacionado à melhora da microcirculação hepática em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), efeitos esses relacionados à transformação dos aminoácidos l-ornitina e l-aspartato em l-glutamina, l-arginina e glutathione, que têm a capacidade de prevenir a lipoperoxidação, bem como atuar como anti-inflamatório e antioxidante. (23) Dessa forma, a fim de explorar os efeitos de LOLA na DHGNA, foi desenhado este estudo, que, em consonância com os estudos mais atuais de combinação de drogas na terapia desta doença, visa avaliar não só LOLA, mas o potencial terapêutico de sua associação com VitE, um reconhecido agente antioxidante.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica

A DHGNA cada vez mais tem adquirido protagonismo entre as diversas causas de doença hepática, dada à sua incidência crescente na população em todo o mundo. (24,25) Outrossim, tem se tornado frequente também em pacientes jovens, incluindo adolescentes e crianças, o que pode ser explicado pelo maior consumo de dietas de perfil ocidental, ou seja, ricas em carboidratos e gorduras *pari passu* com o sedentarismo. (25,26) É notável que o número de óbitos por hepatopatias crônicas tenha aumentado 46% entre 1980 e 2010, o que coincide com o aumento expressivo dos casos de DHGNA. (9,27,28) A doença é associada à síndrome metabólica, ou seja, à presença de hipertensão, diabetes, obesidade e dislipidemia (**Quadro 1**). A sua prevalência é bastante alta, alcançando 16 a 25% na população geral, 40 a 60% em diabéticos e mais de 90% em determinadas populações de indivíduos obesos. (29)

A DHGNA envolve desde a simples deposição de gordura no fígado, a esteatose hepática, podendo progredir para EHNA, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), sendo importante causa de óbito por doença hepática. (29) Espera-se que a DHGNA seja a principal causa de transplante hepático nos EUA nos próximos anos. (2,21,30) Os mecanismos fisiopatológicos da doença envolvem alteração da microcirculação hepática, aumento da permeabilidade intestinal, aumento de citocinas pró-inflamatórias, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e, provavelmente, aumento dos níveis séricos de amônia. (27)

EHNA (**Figura 1**) é caracterizada por esteatose micro e macrogoticular, inflamação e balonização associados a diferentes graus de fibrose. (11) (32) Tem sido

demonstrada incidência significativa de CHC em pacientes com DHGNA e fígados não cirróticos, e ainda não há uma explicação clara para esta evolução. (33,34) A regressão da doença pode ocorrer, conforme a resposta ao tratamento, sendo notável o papel da perda de peso, seja por dieta ou por cirurgia bariátrica, em atingir esse objetivo. (35) Apesar do risco de morte por doença hepática, ainda é a DCV a principal causa de óbitos nesses pacientes. (5)

**Quadro 1** – Critérios diagnósticos para Síndrome Metabólica segundo NCEP-ATP III

Componentes	Níveis
Obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL
HDL Colesterol	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL
A presença de <i>Diabetes mellitus</i> não exclui o diagnóstico de SM	

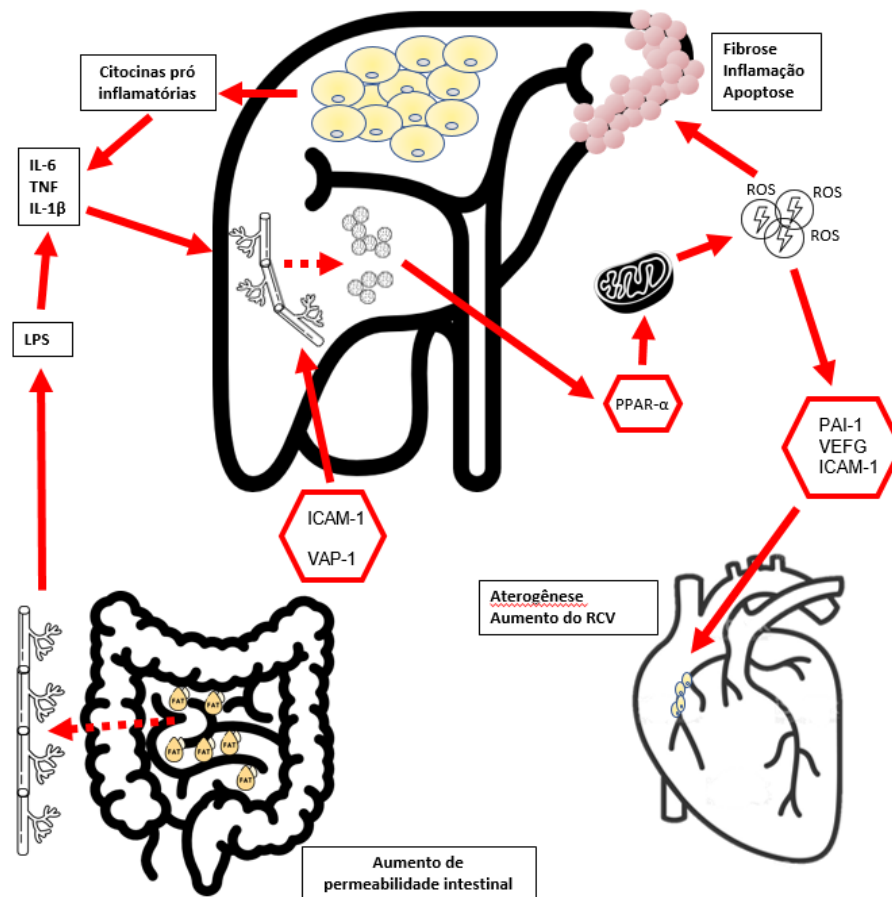
Abreviaturas: NCEP-ATP III: Programa Nacional de Educação do Colesterol – tratamento de adultos; HDL: colesterol de alta densidade; SM: Síndrome Metabólica. Modificado de NCEP painel III (27)



**Figura 1.** Histologia hepática na evolução da DHGNA. A primeira imagem mostra a estrutura normal do fígado. A segunda imagem mostra o processo de esteatose com gotículas de gordura dentro dos hepatócitos e seus núcleos mais periféricos. A terceira imagem mostra o processo inflamatório, a esteatose e a balonização de hepatócitos, características da progressão de DHGNA para EHNA. Imagem adaptada de Xi Jin et al. (36)

## 2.2 Fisiopatologia da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcólica

Conforme discutido, a fisiopatologia da DHGNA não está completamente elucidada. (27) Embora a progressão da doença, suas apresentações clínicas, sinais e sintomas ainda não possam ser totalmente explicados pelo conhecimento atual, sabe-se, entretanto, que há relação com mecanismos como lesão endotelial, estresse oxidativo, inflamação e consequente alteração da estrutura hepática e alterações na microbiota. (37) Há teorias que tentam explicar o mecanismo da DHGNA como a teoria dos “dois golpes” que, resumidamente, é baseada no acúmulo de triglicerídeos associado à RI a que se sucede inflamação hepática e estresse oxidativo. (38) Contudo, essa teoria foi substituída pelos “múltiplos golpes”, com a presença de diferentes fatores, tais como dieta, sedentarismo, obesidade e diabetes ocorrendo simultaneamente em um paciente com predisposição genética (**Figura 2**) (39)



**Figura 2.** Fisiopatologia da DHGNA. O acúmulo de lipídeos no tecido hepático, conhecido como esteatose, aumenta a circulação de citocinas inflamatórias. Estas citocinas agem nos capilares sinusoidais através da ativação do ICAM-1 e VAP-1 facilitando a migração de leucócitos para o tecido hepático. Os leucócitos, geram a inflamação crônica do tecido. O estado pró-inflamatório causado pela esteatose hepática causa o desequilíbrio do sistema oxidante e conseqüente ativação do PPAR- $\alpha$ , responsável por sinalizar a via alternativa de oxidação mitocondrial. O aumento da produção de ROS, através do processo fisiológico do sistema antioxidante acrescido pela oxidação mitocondrial, gera ativação do PAI-1 e ICAM-1 que agem no tecido cardíaco desencadeando o processo de remodelamento do miocárdio e acúmulo de gordura nas coronárias com conseqüente aumento do risco cardiovascular. Ademais, a ativação do VEGF é responsável pela aterogênese e instabilidade de placas aterogênicas. A dieta rica em gordura causa a translocação bacteriana intestinal e a modificação de sua microbiota. Esta alteração é capaz de aumentar a permeabilidade intestinal e, assim, favorecer a passagem de lipopolissacarídeos para a corrente sanguínea os quais são responsáveis, junto com o tecido adipócito, pela ativação de citocinas pró-inflamatórias. IL-6: interleucina 6; TNF: fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ : interleucina-1-beta; LPS: lipopolissacarídeos; ICAM-1: molécula de adesão intercelular; VAP-1: proteína de adesão intercelular; PPAR- $\alpha$ : proliferadores peroxissomais tipo alfa; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; ROS: radicais livres; RCV: risco cardiovascular. (30)

Os triglicerídeos absorvidos da dieta são importante fonte de energia para as células. Essas moléculas são clivadas em ácidos graxos livres (AGL) em um processo intracelular que fornece substrato para a síntese de fosfolipídios e moléculas



sinalizadoras utilizadas em diferentes vias. (40) O acúmulo de AGL na célula ativa uma via de degradação alternativa que envolve a ativação da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, indução do ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa. (41) Estas vias são reguladas por receptores ativados por proliferadores peroxissomais tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ). (29) O processo de estresse oxidativo e a consequente ativação do PPAR- $\alpha$  é responsável pelo desequilíbrio da formação de radicais livres (ROS) e também indução da expressão do gene inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) que, além de induzir a fibrogênese hepática, tem importante papel no aumento de RCV nestes pacientes através de suas ações pró-trombóticas. (29) Ademais, o estresse oxidativo é responsável pela ativação de citocinas inflamatórias e da molécula de adesão intercelular (ICAM-1) a qual induz a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e consequente aumento do RCV através do remodelamento cardíaco. (42) Portanto, o estresse oxidativo é a consequência do desequilíbrio entre a produção de ROS e o funcionamento e capacidade do sistema antioxidante. (42)

As células produzem constantemente ROS através de cadeias energéticas e estes radicais, quando em quantidade dentro da normalidade, são importantes para sinalizar moléculas envolvidas no metabolismo e sobrevivência celular, além de ativar células de defesa. (43) Entretanto, quando há um desbalanço do sistema antioxidante, o acúmulo de ROS pode gerar dano no DNA levando à apoptose e consequente dano hepático. (44) Ademais, a superprodução de ROS leva a peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), o que leva à transformação de macrófagos em células espumosas que são responsáveis por carrear gotículas de gordura. (45) Para manter a homeostase dos ROS há maneiras de balancear e manter estes radicais dentro da normalidade e uma destas maneiras é através do sistema antioxidante da glutathiona.

(46) No entanto, na DHGNA os níveis de glutathiona estão reduzidos, o que favorece o desequilíbrio e acúmulo de ROS no sistema gerando, então, o estresse oxidativo. (47) A ocorrência de estresse oxidativo é o gatilho para a ativação do processo inflamatório sistêmico encontrado na DHGNA. (48) No entanto, parece que isoladamente Schröder et al. evidenciou em seu artigo que a existência de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial secundários ao acúmulo hepático de triglicerídeos não bastam para desencadear o surgimento da EHNA, mas quando concomitantes à dieta rica em gorduras e carboidratos, hiperglicemia e hiperlipidemia promovem o desenvolvimento de EHNA e todas suas características. (45)

Na fisiopatologia da DHGNA a existência de um estado pró-inflamatório é fundamental. (45) As citocinas e seus receptores são fatores centrais no influxo de células imunes para órgãos acometidos por doenças ou danificados para, assim, ativar a cascata inflamatória no local, no entanto, quando esse fenômeno de atração de células ocorre de maneira desequilibrada leva ao desenvolvimento de inflamação crônica e consequente fibrose. (49,50) Em situações fisiológicas, as citocinas são responsáveis por exercer diversas funções autócrinas, parácrinas e endócrinas regulando a resposta inflamatória, apoptose, fibrogênese e regeneração do tecido hepático. (51) O depósito de gordura nos hepatócitos desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1). (52) O TGF- $\beta$  é uma citocina que está envolvida no processo de sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e angiogênese e no fígado é peça-chave no desenvolvimento de fibrose hepática através da ativação de células estreladas, esteatose, infiltração de células inflamatórias, produção de outras citocinas inflamatórias, lesão de hepatócitos e da

ativação do processo de estresse oxidativo e consequente produção de ROS. (53) As células de defesa circulam livremente entre capilares sinusoidais e o tecido hepático regulados pelas células endoteliais que possuem uma combinação de moléculas de adesão que são reconhecidas pela superfície dos leucócitos possibilitando assim a sua migração para o fígado. (51)

A obesidade e a consequente esteatose hepática ativam a cascata inflamatória que gera a maior expressão do ICAM-1 que, em um fígado sem esteatose é encontrado somente na parede de vasos sinusoidais exercendo seu papel fisiológico na passagem de células de defesa para dentro do tecido hepático, no entanto em fígados esteatóticos é encontrado principalmente circundando os locais de depósito de gordura microvesicular. (54) Em pacientes com DHGNA o ICAM-1 sérico é encontrado em maior quantidade quando comparado a pacientes saudáveis e, como citado anteriormente, esse processo é responsável pelo aumento na atividade, migração, adesão e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no tecido hepático. (55) A DHGNA é caracterizada pela necroinflamação, infiltração de leucócitos e apoptose de células hepáticas repletas de conteúdo gorduroso que levam à fibrose e cirrose, e neste processo é que as moléculas que realizam a quimiotaxia de células de defesa, como a proteína de adesão celular vascular (VAP-1), são encontradas. (56) O VAP-1 é responsável, juntamente com o ICAM-1, pela atração de leucócitos para o tecido hepático gerando a reação inflamatória local e desencadeando o processo de estresse oxidativo, papel relevante na fisiopatologia da DHGNA. (55)

O estado pró-inflamatório e a hipóxia que ocorrem na DHGNA geram aumento de citocinas e recrutamento de macrófagos e monócitos e consequentemente o desregulamento do fluxo sanguíneo desencadeia o processo de angiogênese

hepática. (36) Além disso, o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos gera uma distorção na anatomia dos vasos sinusoidais que ficam comprimidos e perdem suas fenestrações, gerando, assim, aumento da pressão portal. (57) Estas alterações são encontradas na transição de DHGNA para EHNA e estão relacionadas ao aumento do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o principal fator na angiogênese patológica em doenças hepáticas crônicas. (58) Ademais, é comprovado que o VEGF tem importante papel na aterogênese e instabilidade de placas lipídicas na doença arterial coronariana. (59) A ruptura da estrutura hepática, causada em parte pela angiogênese, é importante papel na progressão da fibrose, cirrose e CHC. (60)

### **2.3 Microbiota na Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica**

O conceito de eixo intestino-fígado começa com a interação anatômica entre estes dois órgãos e tem início na fase embrionária de formação do corpo humano, quando o fígado se desenvolve a partir do mesmo folheto do intestino. (61,62) Além disso, 75% do sangue que chega ao fígado é proveniente da circulação portal, ou seja, todo sangue que passou pelo intestino será destinado ao fígado. (8) Portanto, o tecido hepático recebe mediadores inflamatórios, partículas de bactérias e endotoxinas derivados da permeabilidade intestinal (59).

O intestino está repleto de bactérias, a microbiota, que vive de modo sinérgico com o corpo humano exercendo funções como digestão de alimentos, produção de vitaminas e modulação da resposta imune (62). *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são os filos encontrados em maior quantidade no intestino, participando de modo significativo na absorção de nutrientes (63). Todavia, cada indivíduo possui sua própria variabilidade na composição da microbiota sem que isso afete as funções intestinais (64). A

identificação desses seres vivos é possível através do sequenciamento do gene 16S rRNA (65).

A obesidade está intimamente relacionada à DHGNA, assim como a microbiota desses indivíduos, que se associa a maior facilidade na absorção de açúcares, assim como à aceleração da liponeogênese hepática e ao acúmulo de triglicerídeos em adipócitos (58). A disbiose ou o desbalanço da microbiota normal, e o aumento da permeabilidade da barreira intestinal estão relacionados à DHGNA, permitindo que mais bactérias ou fragmentos de bactérias cheguem na circulação portal superando a capacidade das células de Kupffer de eliminar estas entidades (66). A ingestão excessiva de gorduras e carboidratos, por sua vez, aumenta a permeabilidade intestinal e facilita a translocação bacteriana.(58) Isso permite que endotoxinas, peptideoglicanos e fragmentos de DNA bacteriano cheguem na circulação portal, gerando uma cascata inflamatória que acelera o processo de fibrose hepática. (35) O desequilíbrio da população de bactérias intestinais com aumento de *Lachnospiraceae*, *Bacteroidetes*, *Ruminococcus*, *Dorea* e *Blautia* e redução de *Bacteroides vulgatus*, *Firmicutes* e *Prevotella* é reportado em pacientes com DHGNA (67).

A permeabilidade intestinal é regulada pelas *tight junctions* que em situações fisiológicas funcionam como barreira para diversos patógenos e endotoxinas, em sua maioria lipolissacarídeos derivados da parede celular de bactérias gram negativas, evitando a sua migração para a corrente sanguínea. (67) Esses patógenos são reconhecidos pelos receptores *toll-like* e desencadeiam uma resposta imune através de citocinas secretadas pelos hepatócitos, células de Kupffer e células estreladas e, resultando em uma cascata inflamatória que leva ao estresse oxidativo. (58) As *tight*

*junctions* são complexos multiproteicos que funcionam como uma barreira seletiva que facilita passagem de íons e solutos através do espaço intracelular e evitam a translocação de antígenos do lúmen intestinal. (68) Elas são formadas pelas ocludinas, moléculas de adesão juncional e claudinas, as duas primeiras atuando na regulação da permeabilidade paracelular, e as últimas na permeabilidade de células endoteliais e epiteliais. (43,69) Claudinas e ocludinas formam as zonas de oclusão.(70,71) Pacientes com DHGNA apresentam maior permeabilidade intestinal, com expressão reduzida das proteínas da zona de oclusão e das moléculas de adesão juncional. (72) A microbiota intestinal tem sido muito estudada e é provável que no futuro seja um alvo terapêutico em uma série de doenças, incluindo a DHGNA. (73)

#### **2.4 MicroRNAs na Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica**

Os microRNAs (miRNAs) são fragmentos de RNA não codificador formados por 19 a 25 nucleotídeos intracelulares que são liberados na corrente sanguínea e têm a capacidade de regular diversos genes, induzindo sua superexpressão ou desregulação (74) Recentemente, foi descoberto que os miRNAs têm importante papel na progressão de DHGNA para EHNA através da indução de apoptose e inflamação, aumento da RI e distúrbio do metabolismo de lipídeos. (75) O entusiasmo com os miRNAs deriva de sua capacidade de refletir o estado fisiológico ou patológico de seu tecido de origem. (73,74) Os miRNAs estão sendo estudados como marcadores biológicos para diagnóstico e prognóstico de de algumas doenças, dentre elas as hepatopatias crônicas.(75)

Na DHGNA o acúmulo intra-hepatocitário de lipídeos promove, via estresse oxidativo e inflamação local, a liberação de miR-122, que é encontrado

predominantemente no fígado e regula o balanço entre o gasto e o armazenamento energético hepático. (70) De fato, no tecido hepático, o miR-122 é responsável por 70% dos miRNAs circulantes, o que o torna altamente específico deste tecido. (76) Os níveis de miR-122 costumam ser elevados na DHGNA e em casos de CHC. (76) Ademais, níveis elevados de miR-122 estão associados à severidade da esteatose hepática, o que pode justificar seu uso como biomarcador na DHGNA. (76,77)

O fator de necrose tumoral e a interleucina 6 desempenham importante papel no desencadeamento do processo inflamatório na DHGNA e medeiam a expressão patológica de miRNAs. (71) O miR-146 está aumentado na DHGNA, mas também no infarto agudo do miocárdio e, juntamente com o miR-33 e o miR-122 são responsáveis por regular a progressão ou regressão da aterosclerose em estágios iniciais da DCV. (78) O miR-33, por sua vez, é fundamental na regulação e transporte de lipídeos, e seu aumento está relacionado à redução dos níveis séricos de HDL-colesterol e à presença de DCV na DHGNA. (78,79) A utilização de antagonistas do miR-33 reduz a aterogênese e melhora o funcionamento mitocondrial e metabolismo lipídico. (80)

A perda progressiva da integridade de cardiomiócitos, através da apoptose, é fator central na progressão da doença cardiovascular nos pacientes com DHGNA. (81) O miR-499 atua na expressão da miosina e no remodelamento do tecido cardíaco, e costuma estar aumentado em pacientes com DCV, em especial na doença coronariana aguda, o que sugere que está associado à severidade da doença aterosclerótica. (76,77,79,81) Resultados similares ocorrem com o miR-186. (82) A disfunção endotelial é o primeiro passo no desenvolvimento da aterosclerose, e marcadores desta disfunção, como o fator de Von Willebrand e a molécula de adesão celular vascular (VCAM), podem ser utilizados como biomarcadores de progressão da

DCV. (83) O miR-126 está pouco expresso em pacientes com DHGNA e sua inibição aumenta a secreção do fator de necrose tumoral (TNF) e gera consequentemente o desencadeamento da cascata inflamatória, através do aumento da expressão de VCAM e da adesão de leucócitos à células endoteliais, sendo este um importante marcador do processo de aterosclerose. (84) Assim, os miR-126, miR-499, miR-186, miR-33 e miR-146 são importantes biomarcadores da presença de placa aterosclerótica em pacientes com DCV (84)

## **2.5 Risco Cardiovascular e Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica**

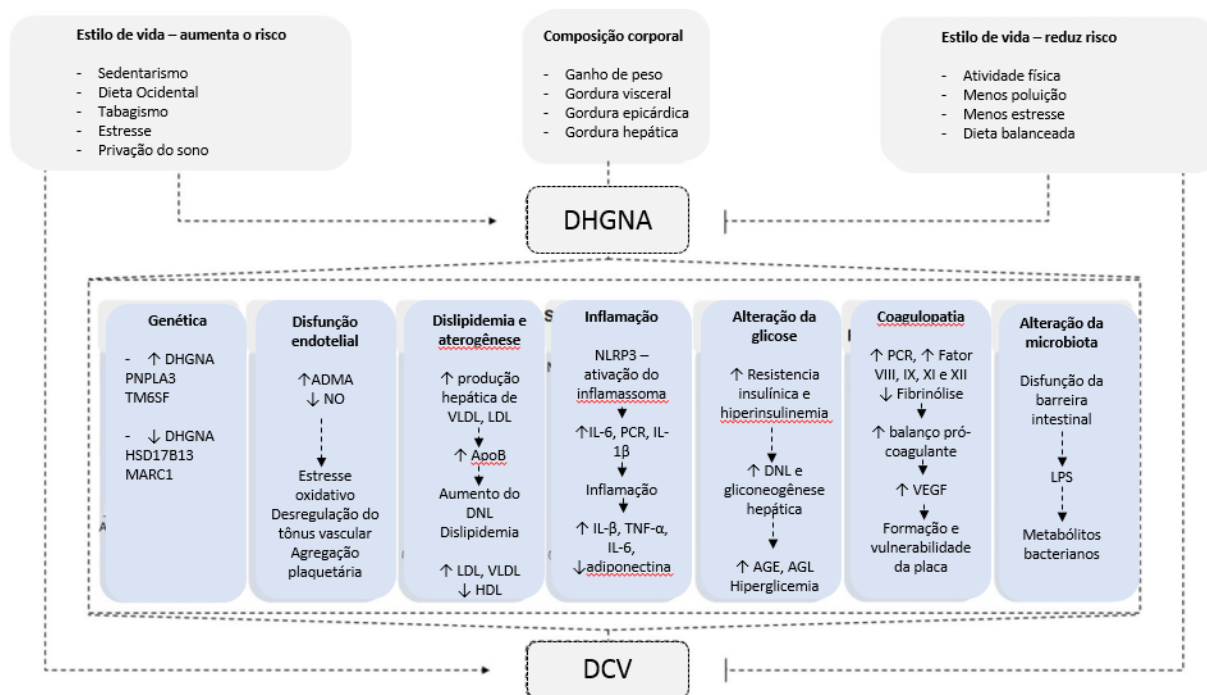
Pacientes com DHGNA possuem elevado RCV (**Figura 3**), com eventos fatais e não fatais mais frequentes na comparação a controles, com correlação positiva com o grau de severidade da doença hepática. (85) Embora a síndrome metabólica seja peça-chave do desenvolvimento de DHGNA e DCV, há estudos que mostram que pacientes com IMC < 25 com diagnóstico ultrassonográfico de esteatose hepática possuem maior número de eventos cardiovasculares, indicando que a presença de DHGNA é fator de risco independente da obesidade. (56)

Habitualmente, pacientes com DHGNA têm SM e, como esperado, apresentam alterações na estrutura e remodelação do tecido cardíaco. (1) A inflamação local e sistêmica e o desequilíbrio no sistema anticoagulante favorecem o acúmulo de placas lipídicas na parede das coronárias. (86) Ghoneim et al. realizou um estudo com 43170 pacientes americanos diagnosticados com EHNA e concluiu que estes indivíduos têm associação positiva com infarto do miocárdio independente dos fatores de risco tradicionais e que pacientes jovens têm ainda maior risco para infarto do miocárdio. (41)



A disfunção endotelial é um dos passos iniciais da progressão da DHGNA e está intimamente relacionada à aterosclerose. (87) Pacientes com SM apresentam níveis séricos elevados de dimetilarginina assimétrica (ADMA), molécula antagonista do óxido nítrico (NO), que está relacionada positivamente com a presença de DCV. (87) Inflamação sistêmica, RI, dislipidemia e o estado pró-trombótico são responsáveis pela elevação dos níveis séricos de PAI-1, que reduz a ativação de plasminogênio em plasmina, com menor degradação da fibrina e, conseqüentemente, trombose. (87)

O estresse oxidativo, fator central da DHGNA, é capaz de aumentar a circulação do ICAM-1 que no fígado aumenta a quimiotaxia e permeabilidade de células de defesa, mas na corrente sanguínea tem relação com maiores níveis de angiotensina II que gera aumento da pressão arterial e conseqüente remodelamento cardíaco. (1) Na DHGNA há ainda depósito de gordura no pericárdio. (87) Em condições normais e baixo estresse oxidativo, os adipócitos do epicárdio nutrem o miocárdio adjacente e secretam substâncias com propriedades protetoras como adiponectina, adipocina anti-inflamatória, antioxidante, antifibrótica e antiaterogênica. (88) Com o aumento do tecido da gordura epicárdica ocorrem algumas mudanças como maior secreção de citocinas pró-inflamatórias que causam a infiltração de macrófagos, ativam vias de fibrose e destroem sistemas de microvascularização que são responsáveis pela hipertrofia ventricular, progressão da doença coronariana, fibrilação atrial e insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada. (37) Todos esses mecanismos associados à DCV justificam que seja estimado o RCV em pacientes com DHGNA, que sejam feitos exames de vigilância da saúde cardiovascular e, mais ainda, que medidas terapêuticas para DHGNA sejam também avaliadas quanto à proteção cardiovascular. (7)



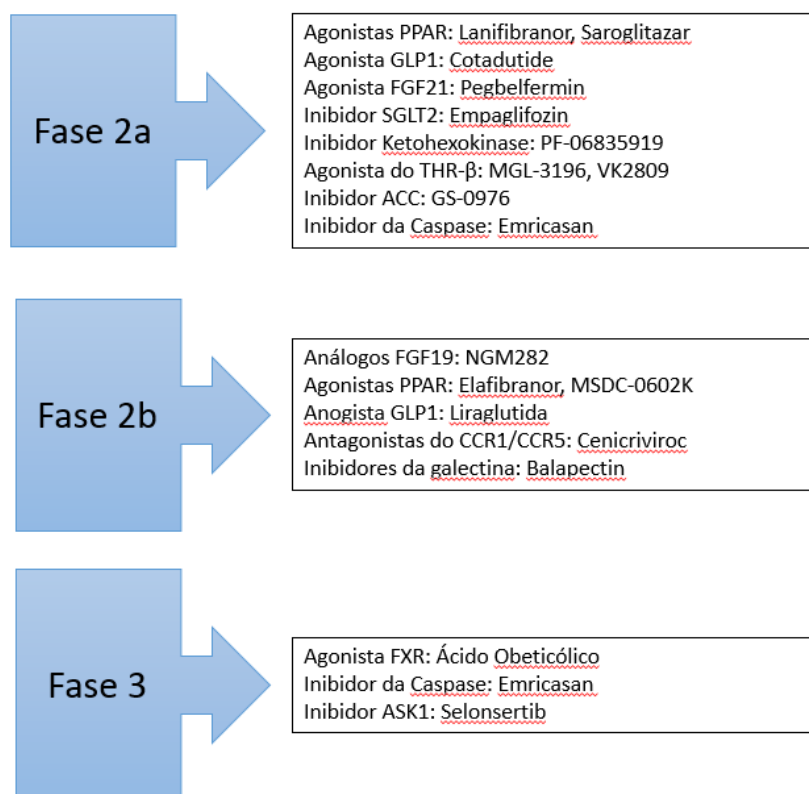
**Figura 3.** Fatores em comum entre DHGNA e a doença cardiovascular. Abreviaturas: PNPLA3: patatin-like phospholipase-3; TM6SF: transmembrane 6 superfamily 2 human gene; HSD17B13: hydroxysteroid dehydrogenase 17beta 13; MARC1: mitochondrial amino acid oxidase reducing component 1; ADMA: dimetilarginina assimétrica; NO: óxido nítrico; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ApoB: apolipoproteína B; DNL: lipogênese De Novo; HDL: lipoproteína de alta densidade; IL-6: interleucina 6; PCR: proteína C reativa; IL-1β: interleucina-1-beta; TNF-α: fator de necrose tumoral; AGE: produtos finais da glicação avançada; AGL: ácidos graxos livres; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial; LPS: lipopolissacarídeos; DCV: doença cardiovascular. Adaptado de Kasper et al. (89)

## 2.6 Tratamento da Doença Hepática Gordurosa Não-alcóolica

Ainda não há um tratamento farmacológico específico para a DHGNA, de forma que pioglitazona e VitE, ainda são as melhores opções para o controle da doença. (37) A VitE ou α-tocoferol, a sua forma mais ativa, é um potente antioxidante da classe das vitaminas lipossolúveis e sua ação é atribuída ao grupo hidroxila que doa hidrogênio para neutralizar radicais livres. (14) Ela é obtida na dieta a partir da ingestão de vegetais, frutas, óleos vegetais e castanhas. (14) Estudos *in vitro* e *in vivo*

demonstraram que a VitE atenua a gravidade de EHNA através de mecanismos que envolvem a regulação da atividade e inibição da enzima superóxido dismutase e inibição de genes relacionados à fibrose e necrose hepatocelular.(90) Ademais, a VitE tem capacidade de regular diversos genes envolvidos na cascata inflamatória, dislipidemia e quimiotaxia celular como o IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e PPAR. (91) O colesterol LDL, dentre as principais proteínas do sangue, é a mais suscetível às variações dos níveis de séricos de glicose. (92) Quando proteínas reagem com moléculas de glicose e lipídeos em uma séria de reações não enzimáticas, elas produzem ROS como os superóxidos e peróxidos de hidrogênio gerando o desbalanço no estresse oxidativo. (11) A VitE pode carrear moléculas de LDL tornando estas moléculas mais resistentes ao processo de oxidação e conseqüentemente há menor produção de ROS. (11) Em humanos a administração da VitE por longos períodos pode incorrer em riscos que devem ser levados em consideração na escolha do tratamento, como a possibilidade do aumento da mortalidade por qualquer causa, como acidente vascular cerebral hemorrágico e câncer. (93) Atualmente, o uso de VitE na DHGNA é recomendado para pacientes não diabéticos e não cirróticos. (11) O uso de Pioglitazona é indicado em pacientes não-cirróticos com ou sem diabetes e seu uso reduz o RCV e a inflamação, mas está relacionado a ganho de peso e osteopenia. (92) Metformina melhora a resistência insulínica e reduz aminotransferases, todavia não tem efeito na histologia hepática. (11) Ácido Obeticólico (OCA), um receptor de ácido biliar, é uma medicação promissora que reduz fibrose, entretanto em estudo recente seu efeito atingiu somente 25% dos pacientes, além do que seu uso aumenta LDL e hemoglobina glicada, (93) e está associado a aumento do RCV.(92) Elafibranor, um agonista do PPAR- $\alpha$  teve resultados semelhantes ao placebo na resolução da fibrose. (94,95) Cenicriviroc, um inibidor do receptor CCR2/CCR5, e resmetirom, um agonista

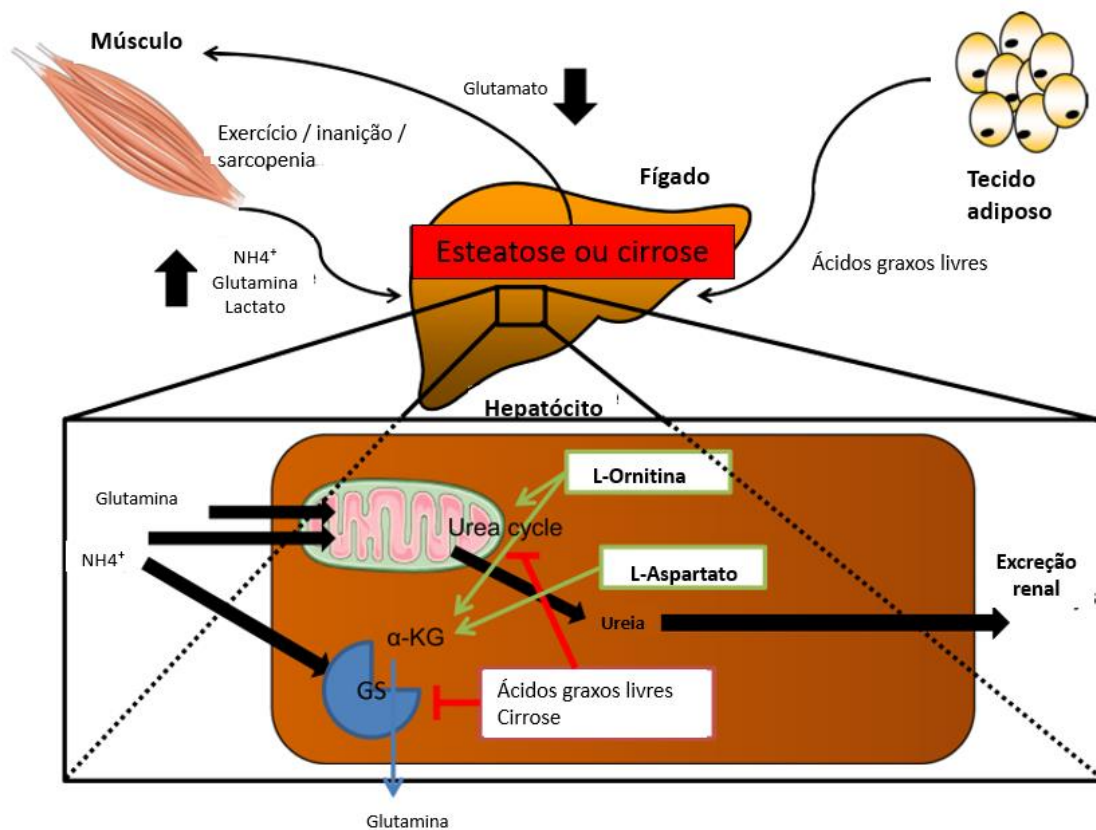
do receptor- $\beta$  do hormônio da tireoide, mostraram melhora da fibrose em estudo fase 2b, e seus estudos em fase III estão em andamento. (96) Aramchol, um conjugado de ácido graxo e ácido biliar, demonstrou melhora na lipogênese hepática e na  $\beta$ -oxidação mitocondrial de AGL, com redução da fibrose. (97) Liraglutida é uma droga promissora e bastante útil em pacientes obesos, promovendo perda de peso, melhora na histologia hepática e redução do RCV. (21) Diversas medicações estão sendo estudadas para o tratamento da DHGNA (**Figura 4**), mas os resultados dos estudos de fase III já publicados são desanimadores. (98)



**Figura 4.** Medicamentos em estudo para tratamento da DHGNA. Abreviaturas: PPAR: Proliferadores Peroxissomais ; GLP1: peptídeo semelhante ao glucagon-1 ; FGF21: fator de crescimento-21 ; SGLT2: cotransportador de sódio-glicose-2; THR- $\beta$ : receptor- $\beta$  do hormônio da tireoide ; ACC: acetil-coenzima A carboxilase ; FGF19: fator de crescimento-19; CCR1: receptor 1 da quimiocina C-C ; CCR5: receptor 5 da quimiocina C-C. Adaptado de Attia et al. (21)

## 2.7 Aspartato de ornitina

LOLA é um conjunto de aminoácidos que atua no ciclo da ureia reduzindo os níveis circulantes de amônia, daí por que indicada no tratamento de encefalopatia hepática em pacientes cirróticos. (95) Estudo prévio realizado em ratos tratados com aspartato de ornitina demonstraram que este composto não age somente no ciclo da ureia, mas também reduzindo o estresse oxidativo em células hepáticas causado por substâncias endógenas. (99) Talvez este efeito seja responsável por manter a integridade da membrana de células hepáticas (95) Além disso, LOLA tem ação hepatoprotetora, que pode estar relacionada ao fato de seus aminoácidos constituintes serem metabolizados e convertidos em glutamato e, na sequência, em glutamina, bem como em l-arginina, aminoácidos com efeito antioxidante e hepatoprotetor. (95) O glutamato, por sua vez, pode ser convertido em glicose, ureia, glutatona ou ornitina e é nesta conversão que há o consumo de amônia, o que pode ser benéfico em casos de cirrose, mas também na esteatose hepática (**Figura 5**). (100) A L-arginina estimula a produção de NO, importante substância que melhora a microcirculação hepática e que se encontra reduzida na DHGNA. (100) Em situações fisiológicas, a amônia produzida no catabolismo de proteínas e aminoácidos é metabolizada no ciclo da ureia e através da glutamino sintetase e para que isso ocorra é necessária a presença de glutamina e do ácido alfacetoglutárico, (100) o principal receptor do grupo amino dos aminoácidos, que é convertido em ácido glutâmico. (100) Na cirrose, tanto a glutamina, ciclo da ureia e o ácido alfacetoglutárico estão reduzidos o que contribui para o acúmulo de amônia e seus efeitos tóxicos. (100)



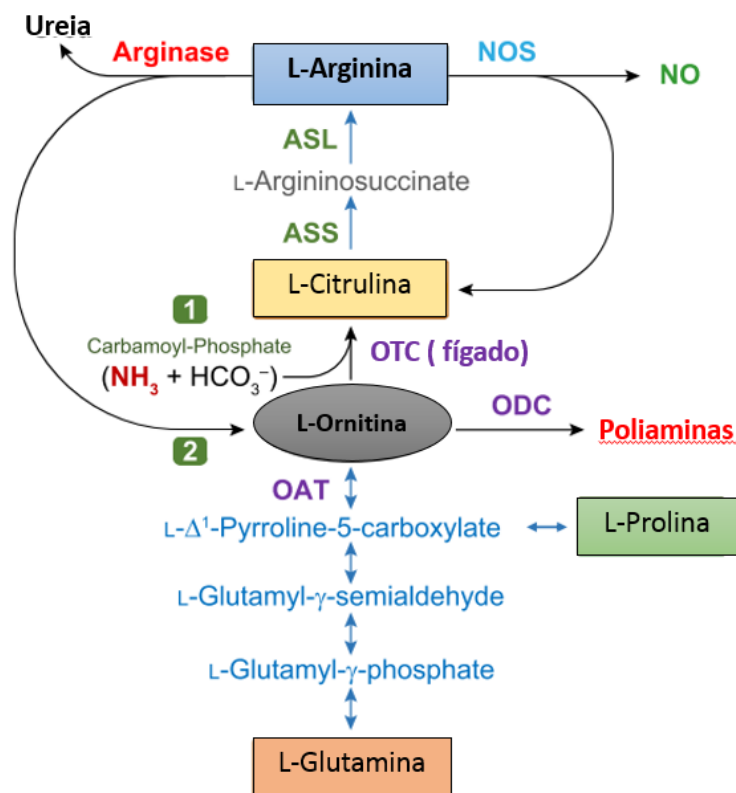
**Figura 5.** Ação de LOLA no metabolismo da amônia.  $\text{NH}_4^+$ : amônio.  $\alpha$ -KG: ácido alfacetoglutárico. GS: glutamino sintetase. Adaptado de Canbay et al. (101)

A arginase (**Figura 6**) tem duas funções essenciais no metabolismo humano: a) metabolismo da amônia através do ciclo da ureia; b) formação de ornitina, que dará origem a prolina e poliaminas. (101) A prolina é necessária para a formação de colágeno e é requisitada quando ocorre a cicatrização de feridas, e as poliaminas são responsáveis pelo crescimento e proliferação celular, resposta inflamatória, desenvolvimento neuronal e reparação tecidual. (101) A arginase é a enzima final do ciclo da ureia que ocorre dentro do fígado e é responsável pelo reinício do ciclo através da formação de L-ornitina e L-citrulina, sendo que esta última consome amônia no processo. (102) O processo de formação da arginase depende da presença de L-

ornitina que será catabolizada em L-citrulina e por fim em L-arginina. (103) A L-arginase pode ter dois destinos, a formação de NO essencial para manter o fluxo sanguíneo nas artérias, principalmente nas coronárias, e a formação da arginina que irá reiniciar o ciclo da ureia. (103) A L-arginina é o único substrato para a formação de NO e neste processo é formada juntamente a L-citrulina. (100) O NO, por ser um radical livre, é rapidamente inativado por superóxidos, moléculas produzidas no processo de oxidação celular, e desta reação é formado o peroxinitrito. (101) O desequilíbrio entre a produção de superóxidos e de NO gera a redução da atividade do NO na circulação sistêmica e conseqüente perda da capacidade de vasodilatação arterial. (100) Kircheis et al. demonstraram que a utilização de LOLA em ratos aumenta a produção de ureia no fígado, atestada pelo aumento em 40% da enzima arginase e pela queda dos níveis de amônia séricos. (21) No processo de catabolismo do NO há também liberação de L-citrulina, este aminoácido que faz parte do ciclo da ureia e é o precursor da formação de arginina nos rins e tem efeito na melhora do metabolismo lipídico através da redução de triglicerídeos e da lipogênese *de novo*. (100) O estudo de Jegatheesan et al. demonstrou que a administração exógena de citrulina em pacientes com dieta rica em frutose reduz níveis séricos de triglicerídeos, melhora a sensibilidade à insulina e diminui a inflamação por meio da redução da interleucina-6 e TLR-4. (104,105)

A DCV em pacientes com DHGNA está relacionada ao processo inflamatório encontrado nesta condição clínica, como citado anteriormente. A elevada resistência vascular periférica aumenta a expressão e atividade da arginase com conseqüente redução do NO, aumento da produção de superóxido e consumo de L-arginina. (106) A administração de L-arginina é capaz de reduzir os níveis tensionais, aumentar a

excreção renal de sódio e água, reduzir a espessura da parede do ventrículo esquerdo, inibir o crescimento de placas ateromatosas e reduzir a resistência vascular pela vasodilatação dos vasos sanguíneos. (107) Pacientes diabéticos têm menor biodisponibilidade de L-arginina visto que estes pacientes apresentam uma expressão e atividade aumentada de arginase e estudos mostraram que a administração de um inibidor de arginase melhorou a vasodilatação vascular e a disfunção coronariana. (108) No estudo de Butterworth & Canbay há evidência que a administração de LOLA em pacientes com doenças hepáticas crônicas foi capaz de aumentar os níveis séricos de L-arginina tendo maior disponibilidade para a formação de NO e com isso melhorar a microcirculação destes pacientes. (109)



**Figura 6.** Metabolismo da L-Arginina. NOS: óxido nítrico sintase. NO: óxido nítrico. ASL: argininosuccinato liase. ASS: argininosuccinato sintase. OTC: ornitina transcarbamilase. ODC: ornitina descarboxilase. Adaptado de Caldwell et al. (9,27,28)



## 2.8 Modelos experimentais na Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica

Modelos experimentais são úteis para o entendimento de doenças e na avaliação de possíveis alvos terapêuticos em estudos pré-clínicos. (4,35) Diversos mamíferos podem ser utilizados no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da doença, mas os camundongos e ratos são utilizados com maior frequência. (35) Em relação aos ratos, os Sprague Dawley são mais suscetíveis ao desenvolvimento de EHNA quando alimentados com dieta rica em gordura. (35) Oseini et al, em 2018, revisaram os modelos animais para pesquisa clínica em DHGNA, reforçando sua importância no desenvolvimento de novas drogas, uma vez que ainda faltam medicamentos eficazes em seu controle, e que há mais de 30 diferentes alvos que podem ser manipulados na doença. (92) Os autores consideram que o modelo experimental que atendesse aos seguintes requisitos seria próximo ao ideal: a) não ser geneticamente modificado; b) envolver obesidade induzida por dieta; c) utilizar dieta com ao menos uma composição de macronutrientes similar ao que ocorre na doença em humanos; d) desenvolver deposição de gordura, resistência insulínica e dislipidemia; e) demonstrar estado inflamatório sistêmico; f) ativar caminhos de sinalização relevantes para a progressão da doença em humanos; g) ter concordância transcriptômica e lipídômica com a doença em humanos; g) promover alterações histológicas similares à doença clínica, com progressão para fibrose avançada e carcinoma hepatocelular. (104) Silva et al. realizaram um estudo com o objetivo de padronizar o modelo experimental e avaliar o efeito da dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC) no desenvolvimento da esteatose hepática, EHNA e fibrose hepática em ratos Sprague-Dawley. (108) Neste estudo foi demonstrado que, animais alimentados com DHDC por quatro meses apresentaram intensa balonização,

esteatose microgoticular e inflamação lobular com discreta fibrose hepática. Os animais que receberam DHDC por oito meses apresentaram ainda esteatose macrogoticular e um maior grau de fibrose hepática. Os autores concluíram que a DHDC foi capaz de induzir a esteatose hepática e EHNA com fibrose, servindo de modelo experimental para melhor entendimento da doença. (11) Este modelo foi reproduzido recentemente em nosso laboratório, em parceria com o grupo original. (100) Neste estudo, ratos Sprague-Dawley receberam DHDC e água *ad libitum* durante 16 semanas. Ao término do experimento os animais foram eutanasiados. Na avaliação histopatológica, os animais que receberam DHDC apresentaram esteatose predominantemente microvesicular associada à esteatose macrovesicular de intensidade moderada, atividade inflamatória e discreto grau de fibrose em alguns casos, características estas semelhantes à doença em humanos. (109)

### 3. JUSTIFICATIVA

A DHGNA afeta em torno de 20 a 25% da população ocidental e é associada a alterações significativas do metabolismo glicêmico e lipídico, com a presença de resistência insulínica e dislipidemia, inflamação sistêmica e disbiose da microbiota intestinal. A doença leva a desfechos significativos hepáticos e cardiovasculares, que impactam na morbimortalidade a ela associada. Apesar de sua importância clínica e epidemiológica, as opções terapêuticas na DHGNA, além da perda de peso, são ainda limitadas. Pioglitazona e/ou vitamina E são recomendadas no tratamento da doença, com efeitos na esteatose e na inflamação, mas sem impacto significativo na fibrose hepática, que é o principal fator associado à progressão da doença. Assim, é justificável que se busquem novas alternativas de tratamento, o que vem sendo feito de forma intensiva nos últimos anos. Porém, os recentes resultados dos estudos de fase III são muito tímidos. Com o retorno a estudos de fase II e a avaliação prospectiva da combinação de drogas, é esperado que medidas farmacológicas efetivas somente estejam disponíveis próximo ao final desta década. Aos desfechos habituais hepáticos, em especial bioquímicos e histológicos, é importante que seja avaliada a proteção cardiovascular. Entretanto, mesmo algumas das drogas mais novas no tratamento da doença, como cenicriviroc e aramchol, não têm efeitos marcados na doença cardiovascular. Recentemente foi sugerido que LOLA, uma droga que atua no metabolismo da amônia e é usada para o tratamento da encefalopatia hepática, pode ter efeitos benéficos hepáticos e cardiovasculares na DHGNA, em função da conversão de seus aminoácidos constituintes em glutamato, glutamina e l-arginina e sua influência na produção de óxido nítrico. Entretanto, as evidências são muito iniciais, e sua aplicação em modelo animal pode ser útil para a testagem de hipóteses

que possam ser exploradas em estudos clínicos. Assim, a importância da DHGNA, as limitações de seu tratamento, o interesse crescente em desfechos compostos hepáticos e cardiovasculares, bem como o potencial terapêutico ainda não definido de LOLA, isolada ou em associação à vitamina E, justificam este estudo.

#### **4. QUESTÃO DE PESQUISA**

O uso de LOLA em associação à vitamina E é superior ao uso isolado de ambas as drogas na DHGNA em modelo animal, em relação a desfechos hepáticos e cardiovasculares?

## **5. HIPÓTESE**

O uso de LOLA em associação à vitamina E é superior ao uso isolado de ambas as drogas na DHGNA em modelo animal, em relação a desfechos hepáticos e cardiovasculares.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito terapêutico da associação de LOLA e Vitamina E em modelo experimental de DHGNA induzido por dieta hiperlipídica deficiente em colina em ratos.

### **6.2 Objetivos Secundários**

1. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas em relação à gravidade histológica da lesão hepática induzida no modelo animal;

2. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas no acúmulo de lipídeos hepáticos nos animais estudados;

3. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na quantificação hepática de fibrose nos animais estudados através da quantificação de unidades de luminescência em lâminas histológicas;

4. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas no perfil hepático dos animais estudados através da análise bioquímica de AST, ALT e albumina;

5. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas no perfil glicêmico e lipídico dos animais estudados através da análise bioquímica de glicemia, colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos;

6. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas sobre marcadores de inflamação sistêmica e disfunção endotelial

nos animais estudados, através da determinação de leptina, MCP-1, PAI-1, adiponectina, E-Selectina e ICAM-1;

7. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas nos marcadores de estresse oxidativo nos animais estudados através da avaliação dos marcadores GPX, GR, GST, TBA e SOD;

8. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na expressão gênica dos receptores *toll like* e da proteína adaptadora *Myd88* no tecido hepático dos animais estudados;

9. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na expressão gênica de mediadores inflamatórios no tecido hepático dos animais estudados, através da expressão de IL6, IL10, IL1B e TNFa;

10. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na concentração da proteína de adesão vascular (VAP)-1 no tecido hepático dos animais estudados;

11. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na expressão sérica dos microRNAs miR-186, miR-499, miR-146a, miR-33a, miR-122 e miR-126 nos animais estudados;

12. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na expressão gênica das moléculas de junção intestinal dos animais estudados, através da expressão de Ocln, ZO-1, JAM-1, Cldn1, Cldn2 e Cldn4;

13. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas na microbiota intestinal dos animais estudados;



14. Comparar os efeitos da associação LOLA e vitamina E ao uso isolado de ambas as drogas no peso da gordura epicárdica e nos índices aterogênicos nos animais estudados através do cálculo do índice de Castelli-I e Castelli-II e do coeficiente aterogênico.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo é resultado de uma linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório Experimental em Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre há alguns anos. O interesse do grupo em relação à doença gordurosa alcoólica e não-alcoólica, que, a despeito dos fatores de risco diversos — o consumo abusivo de álcool ou a obesidade e a síndrome metabólica, convergem em vários pontos, dentre eles a importância epidemiológica e a ausência de um tratamento farmacológico eficaz, fez com o que o grupo a elas se dedicasse. Algumas tentativas foram feitas com modelos em *zebrafish* em ambas as condições clínicas, mas elas foram frustradas em relação à DHGNA, em especial nos experimentos com indução da doença por oferta de frutose. Assim, o grupo voltou seu foco a ratos e desenvolveu, em parceria com a Profa. Claudia P. Oliveira, da Universidade de São Paulo, o modelo que foi aqui estudado. Este modelo já foi reproduzido pelo grupo em outras oportunidades. É um modelo simples, de indução por dieta, e que tem resultados bastante uniformes. Embora não seja um modelo barato, ele prescinde do uso de animais geneticamente modificados, o que é uma vantagem, e promove distúrbio metabólico similar ao que ocorre na DHGNA nos humanos, incluindo obesidade, deposição de gordura visceral, alteração do perfil glicêmico e lipídico, inflamação hepática e sistêmica, disbiose da microbiota, lesão cardíaca e dano hepatocelular, como já demonstrado. Nesta tese, o modelo volta a demonstrar sua reprodutibilidade, e aqui, pela primeira vez, presta-se ao estudo de novas drogas no tratamento da DHGNA. Importante notar que no modelo os animais têm a doença induzida em 16 semanas, e que a extensão do mesmo para o tratamento farmacológico por mais 12 semanas não piora o estado clínico dos mesmos, a despeito do ganho de peso que ocorre.

A DHGNA atualmente representa o maior campo de pesquisa em doenças hepáticas. Várias drogas e vários alvos terapêuticos distintos têm sido avaliados, com modesto sucesso. Vários estudos de fase II nos últimos anos mostraram potencial utilidade de algumas drogas, como elafibranor, selonsertibe e cenicriviroc. Resultados de estudos de fase III eram esperados para 2019, e estimava-se que o tratamento poderia ser fortemente impactado por eles. Não foi o que aconteceu, entretanto, e houve um retorno a estudos de fase II, em especial testando combinações de drogas, o que é compreensível e até esperado para uma doença crônica, complexa e de origem metabólica. Os resultados dos novos estudos são aguardados para os próximos anos, porém são estudos com seguimento a longo prazo, o que faz crer que um tratamento medicamentoso realmente eficaz somente seja aprovado no final desta década. Desde o início deste século o tratamento da DHGNA envolve o uso de pioglitazona e/ou vitamina E em pacientes com demonstração de EHNA por biópsia. Essa intervenção farmacológica, entretanto, é insuficiente, e outras alternativas têm sido estudadas, com resultados pouco animadores, com drogas como ácido ursodesoxicólico, ômega 3, probióticos, n-acetilcisteína e outros agentes antioxidantes. Isso é compreensível, pois, na falta de outras opções terapêuticas, resta aos pacientes a mudança de estilo de vida, com exercícios físicos e o emagrecimento, como única forma efetiva de tratamento. Embora a perda de peso acima de 10% do peso corporal seja uma estratégia claramente associada à resolução da doença, atingir essa meta é para muito poucos. Assim, ainda há espaço para o estudo de novas drogas em modelo experimental.

O presente estudo é inédito. Até o momento, a associação LOLA e vitamina E ainda não havia sido estudada em humanos ou em modelos animais no tratamento da DHGNA. O referencial teórico para seu uso e associação foi discutido

nesta tese, e não cabe aqui repeti-lo. Os resultados encontrados, especialmente quando avaliados em relação ao grupo DHGNA (animais que receberam DHDC e gavagem com água destilada) são interessantes. A associação reduziu os níveis de AST, a principal enzima que atesta lesão hepática, bem como correlacionou-se com melhora na histologia hepática em comparação aos demais grupos que receberam DHDC. Entretanto, a quantificação de fibrose diminuiu de forma significativa apenas no grupo que recebeu LOLA isoladamente. Este resultado deve ser mais bem avaliado, como discutido no artigo, e talvez a quantificação da densidade de fibras elásticas, cuja primeira coorte foi publicada pelo grupo em pacientes com DHGNA ainda este ano, possa ser um método interessante para analisar este resultado com mais detalhes. De qualquer forma, a redução quantitativa da fibrose com LOLA é um achado novo e que merece ser mais explorado. A associação exerceu efeito benéfico no risco cardiovascular aferido pelos escores aterogênicos. Em que pese a crítica possível de que esses escores não costumam ser aplicados na prática clínica, há evidências de sua utilidade. Eles refletem a melhora induzida pela associação LOLA e vitamina E na dislipidemia aterogênica e reforçam o potencial da associação tendo em vista a sua influência positiva nos dois principais desfechos possíveis em estudos na DHGNA, o hepático e o cardiovascular.

Os benefícios da associação sobre o fígado e o coração devem ser mais avaliados. Algumas determinações estavam previstas para este estudo, mas não foram realizadas em função da pandemia de COVID-19 e o contingenciamento das atividades na Unidade de Experimentação Animal do HCPA. Todo o material está armazenado, entretanto, e sua avaliação será feita em momento oportuno, uma vez que são objetivos desta tese e podem contribuir para o entendimento dos resultados

obtidos. Até agora, de fato, não demonstramos os resultados da inflamação sistêmica, ponto chave para o entendimento dos mecanismos que levam à DHGNA, bem como não analisamos a expressão de microRNAs, conforme previsto. Além disso, não foi feita a análise do estresse oxidativo, questão muito importante quando se tem em mente o mecanismo de ação das drogas utilizadas neste experimento.

Quanto ao RCV, é essencial que avaliemos marcadores de lesão endotelial. Este material está coletado para análise na sequência. Aqui também a avaliação dos microRNAs poderá ser muito útil. Um artigo recente chama atenção para o uso do índice aterogênico do plasma (AIP), obtido através do uso de triglicerídeos e HDL, demonstrando sua utilidade na predição de DCV em pacientes diabéticos (citar Ma et al, *Lipids Health Dis* 2020 - 10.1186/s12944-020-01418-0). Este índice será incorporado ao estudo. Uma avaliação prevista, mas não incluída nesta tese, é a análise da integridade de cardiomiócitos, uma técnica desenvolvida pelo grupo que através da captura eletrônica de imagens de tecido cardíaco permite avaliar algumas de suas características. Avaliando este mesmo modelo já demonstramos que a DHGNA altera de forma significativa os cardiomiócitos, e isso merece ser estimado após o tratamento farmacológico aqui feito.

A microbiota intestinal é fator determinante da DHGNA e tem efeito também no RCV. Neste mesmo modelo já demonstramos que a disbiose está associada à inflamação sistêmica e ao dano hepático e cardíaco. A associação LOLA e vitamina E, bem como a vitamina E de forma isolada, estiveram relacionadas a menor expressão hepática de *Tlr4* e *Myd88*, o que é um efeito benéfico. Interessante será avaliar se esses achados independem da modulação da microbiota intestinal,

conforme o esperado. Porém, para tal há que determinarmos a microbiota dos animais estudados. O material, uma vez mais, está armazenado para análise futura.

Este estudo traz informações inéditas em relação ao uso de LOLA e LOLA associada à vitamina E no tratamento da DHGNA, mas apresenta limitações. Uma das limitações é o número de animais por grupo que por certo restringiu a determinação de diferença estatística em alguns dos parâmetros avaliados. Outro ponto a ser discutido são as doses das drogas, baseadas em evidências limitadas. Além disso, a manipulação excessiva dos animais, em função das gavagens diárias, pode ter trazido algum viés. Em que pese o alto número de determinações laboratoriais, neste estudo não foi realizada a determinação de aminoácidos no sangue e no tecido hepático dos animais, o que poderia ter trazido informações relevantes, haja vista, especialmente, a composição de LOLA e seu mecanismo de ação.

Em contrapartida, alguns pontos positivos merecem ser destacados, além do ineditismo na avaliação da associação LOLA e vitamina E, bem como do uso isolado de LOLA, no tratamento da DHGNA experimental. O modelo certamente é um ponto positivo. Neste estudo, todos os animais que receberam DHDC desenvolveram DHGNA. Além disso, não houve perdas durante o experimento e foi realizada uma extensa avaliação de vários eventos primordiais na fisiopatogênese da DHGNA, com vistas ao entendimento de um possível efeito das drogas.

Assim, neste modelo, a associação LOLA e vitamina E parece ter exercido efeito benéfico no tratamento da DHGNA.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Francque SM, Graaff D Van Der, Kwanten WJ. Review Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk : Pathophysiological mechanisms and implications. J Hepatol [Internet]. 2016;65(2):425–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.005>
2. Sporea I, Popescu A, Dumitraşcu D, Brisc C, Nedelcu L, Trifan A, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Status Quo. J Gastrointestin Liver Dis. 2018;27(4):439–48.
3. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z SA. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. Hepatology. 2016;67(1):123–33.
4. Siddharth S, Mohammad P, Siddiqui S. Current and Emerging Therapies for Non - alcoholic Fatty Liver Disease. Drugs [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1040-1>
5. Jin X, Chen Y, Kong M, Zheng L, Yang Y, Li Y. Transition from hepatic steatosis to steatohepatitis : Unique microRNA patterns and potential downstream functions and pathways. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27(2):331–40.
6. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018;67(1):328–57.

7. Clarke MW, Burnett JR. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(5):417–50.
8. Han R, Ma J, Li H. Mechanistic and therapeutic advances in non-alcoholic fatty liver disease by targeting the gut microbiota. *Front Med.* 2018;12(6):645–57.
9. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Mol Basis Dis [Internet].* 2018;1865(5):943–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.023>
10. (EASL) EA for the S of the L, (EASD) EA for the S of D, (EASO) EA for the S of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Facts.* 2016;9:65–90.
11. Arab JP, Dirchwolf M, Álvares-da-Silva MR, Barrera F, Benítez C, Castellanos-Fernandez M, et al. Latin American Association for the study of the liver (ALEH) practice guidance for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol [Internet].* 2020;19(6):674–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.09.006>
12. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328–57.
13. Oseini A, Sanyal AJ. Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver int.* 2017;1(1):97–103.
14. Chang C, Hsieh R, Wang H. Effects of Glucose and alfa-tocopherol on Low-Density Lipoprotein Oxidation and Glycation. *Ann N Y Acad Sci.*



2005;1042(1):294–302.

15. Et G, Cs S, Ss S, Vilstrup H, LI G, My M. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis ( Review ). Cochrane Database Syst Rev. 2019;15(5).
16. Sumida Y, Yoneda M, Tokushige K, Kawanaka M, Fujii H. Antidiabetic Therapy in the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1907):1–22.
17. Qureshi K, Neuschwander-Tetri BA. The molecular basis for current targets of NASH therapies. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 2020;29(2):151–61. Available from: <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1703949>
18. Loman BR, Hernández-Saavedra D, An R, Rector RS. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2018;76(11):822–39.
19. Charytoniuk T, Drygalski K, Konstanynowicz-Nowicka K, Berk K, Chabowski A. Alternative treatment methods attenuate the development of NAFLD: A review of resveratrol molecular mechanisms and clinical trials. *Nutrition* [Internet]. 2017;34:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.001>
20. de OLIVEIRA CPM de S, Cotrim HP, Stefano JT, Siqueira ACG, Salgado ALA, Parise ER. N-acetylcysteine and/or ursodeoxycholic acid associated with metformin in non-alcoholic steatohepatitis: An open-label multicenter randomized controlled trial. *Arq Gastroenterol*. 2019;56(2):184–90.
21. Butterworth RF, Canbay A. Hepatoprotection by L-Ornithine L-Aspartate in

- Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2018;37:63–8.
22. Mazhar K. The future of nonalcoholic fatty liver disease treatment. *Med Clin North Am*. 2019;103(1):57–69.
  23. Lazar MV, Eapen M, Nair HR, Siyad I, Gopalakrishna R. Correlation between insulin resistance and liver histology in patients with nonalcoholic steatohepatitis with and without obesity. *Indian J Gastroenterol*. 2020;39(1):42–9.
  24. Younossi ZM. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease — A Global Public Health Perspective. *J Hepatol* [Internet]. 2018;(October). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>
  25. Welzen BJ Van, Mudrikova T, Idrissi A El, Hoepelman AIM, Arends JE. A Review of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in HIV- Infected Patients : The Next Big Thing ? *Infect Dis Ther* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1007/s40121-018-0229-7>
  26. Yu SJ. A concise review of updated guidelines regarding the management of hepatocellular carcinoma around the world : 2010-2016. 2016;7–17.
  27. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018;13:321–50.
  28. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
  29. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Free Radical Biology and Medicine Role of

- oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;152(March):116–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
30. Dornas W, Shuppan D. Mitochondrial oxidative injury: A key player in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol*. 2020;49(0).
  31. Expert panel on detection evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report (NCEP) -adult treatment panel III. *J Am Med Assoc*. 2001;285(19):2486–97.
  32. Carrilho FJ, Alves de MATTOS A, Vianey AF, Cerqueira VEZOZZO DP, Marinho F, Souto FJ, et al. Brazilian Society of Hepatology recommendations for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Arq Gastroenterol*. 2015;52.
  33. Kikuchi L, Oliveira CP, Alvares-Da-Silva MR, Tani CM, Diniz MA, Stefano JT, et al. Hepatocellular Carcinoma Management in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2016;39(5):428–32.
  34. Cotrim HP, Oliveira CP, Coelho HSM, Alvares-da-Silva MR, Nabuco L, Parise ER, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. *Clinics*. 2016;71(5):281–4.
  35. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001>
  36. Francque SM, Graaff D Van Der, Kwanten WJ. Review Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk : Pathophysiological mechanisms and

- implications. *J Hepatol* [Internet]. 2016;xxx:1–19. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.005>
37. Hadi H El, Vettor R, Rossato M. Vitamin E as a Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Reality or Myth ? *Antioxidants*. 2018;
  38. Tardelli M, Id O, Bruschi FV, Id O. The role of metabolic lipases in the pathogenesis and management of liver disease. *Hepatology*. 2020;0–3.
  39. Simões IC., Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.019>
  40. Henkel AS, Khan SS, Olivares S, Miyata T, Vaughan DE. Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Attenuates Hepatic Steatosis but Does Not Prevent Progressive Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatol Comun*. 2018;2(12):1479–92.
  41. Ito S, Yukawa T, Uetake S, Yamauchi M, Hepatitis A, Hospi- AM, et al. Serum Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis : Comparison With. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(1):83–7.
  42. Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease ( NAFLD ): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci* [Internet]. 2019;0(0):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1080/17461391.2019.1571114>
  43. Mann JP, Raponi M, Nobili V. Clinical implications of understanding the association between oxidative stress and pediatric NAFLD. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017;11(4):371–82. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1080/17474124.2017.1291340>

44. Goto T, Itoh M, Suganami T, Kanai S, Shir I. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2018;8(1):8157.
45. García-galiano D, Sánchez-garrido MA, Espejo I, Montero JL, Costán G, Marchal T, et al. IL-6 and IGF-1 are Independent Prognostic Factors of Liver Steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Obes Surg.* 2007;17(4):493–503.
46. Schröder T, Kucharczyk D, Bär F, Pagel R, Derer S, Jendrek ST, et al. Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Metab [Internet].* 2016;5(4):283–95. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.010>
47. Konopski Z, Løberg EM, Haukeland JW, Dama JK, Bjørø K, Haaland T, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol.* 2006;44(6):1167–74.
48. Marra F, Tacke F. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology [Internet].* 2014;147(3):577-594.e1. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.043>
49. Yokoyama H, Masaki T, Inuoe I, Nakamura M, Mezaki Y, Saeki C, et al. Histological and biochemical evaluation of transforming growth factor- $\beta$  activation and its clinical significance in patients with chronic liver disease.pdf. *Heliyon.* 2019;5(2).

50. Yang L, Seok Roh Y, Song J, Zhang B, Liu C, Loomba R, et al. TGF- $\beta$  Signaling in Hepatocytes Participates in Steatohepatitis Through Regulation of Cell Death and Lipid Metabolism.pdf. *Hepatology*. 2014;59(2):483–95.
51. Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte Traffic Through Sinusoidal Endothelial Cells Is Regulated by Hepatocytes. *Hepatology*. 2005;41(3):451–9.
52. Marmur J, Eckes K, Glaumann H, Frelin L, Rosenberg P, Sta PER, et al. Microvesicular fat , inter cellular adhesion molecule-1 and regulatory T-lymphocytes are of importance for the inflammatory process in livers with non-alcoholic steatohepatitis. *APMIS*. 2011;119(7):412–20.
53. Sanches SCL, Ramalho LN, Augusto MJ, Mara D, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis : A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
54. Torok NJ. VAP-1 in NASH: A novel biomarker. *Hepatology*. 2015;62(4):1313–5.
55. Coulon S, Legry V, Heindryckx F, Steenkiste C Van, Casteleyn C, Olievier K, et al. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathophysiology of Nonalcoholic Steatohepatitis in Two Rodent Models. *J Hepatol*. 2013;57(5):1793–805.
56. Francque S, Laleman W, Verbeke L, Steenkiste C Van, Casteleyn C, Kwanten W, et al. Increased intrahepatic resistance in severe steatosis : endothelial dysfunction , vasoconstrictor overproduction and altered microvascular architecture. *Lab Invest*. 2012;92(10):1428–39.

57. Coulon S, Legry V, Heindryckx F, Steenkiste C Van, Casteleyn C, Olievier K, et al. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathophysiology of Nonalcoholic Steatohepatitis in Two Rodent Models. *Hepatology*. 2012;57(5):1793–805.
58. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med*. 2019;11(2):1–13.
59. Nikolaos KOUKIAS, Elena BUZZETTI EAT. Intestinal hormones, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol*. 2017;42(2ne):184–94.
60. Marco Poeta LP and PV. Gut–Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children*. 2017;66(4):1–19.
61. Borrelli A, Bonelli P, Maria F, Gold ID, Evans JL, Maria F, et al. Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non- alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma : Current and innovative therapeutic approaches. *redox biol*. 2018;15(January):467–79.
62. Gkolfakis P, Dimitriadis G, Triantafyllou K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int [Internet]*. 2015;14(6):572–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872\(15\)60026-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1499-3872(15)60026-1)
63. Ma J, Zhou Q, Li H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease : insights on mechanisms and therapy. *Nutrients*. 2017;9(10).
64. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(7):412–25.

65. Houghton D, Stewart CJ, Day CP, Trenell M. Gut Microbiota and Lifestyle Interventions in NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):447.
66. Lau LHS, Wong SH. Microbiota, Obesity and NAFLD. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1061:111–25.
67. Groschwitz K, Hogan S. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):3–20.
68. Sarin SK, Pande A, Schnabl B. Microbiome as a therapeutic target in alcohol-related liver disease. *J Hepatol [Internet].* 2019;70(2):260–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.019>
69. Korf H, Boesch M. Macrophages as Key Players during Adipose Tissue – Liver Crosstalk in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2019;39(3):291–300.
70. Ying Feng Y, Qin Xu X, Bo Ji C, Mei Shi C, Rong Guo X, Fen Fu J. Aberrant Hepatic MicroRNA Expression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(6):1983–97.
71. Xu H, Li J, Zhao Y, Liu D. TNF $\alpha$ -induced downregulation of microRNA-186 contributes to apoptosis in rat primary cardiomyocytes.pdf. *Immunobiology.* 2017;222(5):778–84.
72. Pirola CJ, Gianotti TF, Castaño GO, Mallardi P, Martino JS, Mora M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease : from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64(5):800–12.



73. Mehta R, Otgonsuren M, Younoszai Z, Allawi H, Raybuck B, Younossi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ Open Gastroenterol.* 2016;3(1):1–8.
74. Trivedi HD, Connelly MA, Filozof C, Howard K, Parrish ML. Differential Associations of Circulating MicroRNAs With Pathogenic Factors in. *Hepatol Commun.* 2020;4(5):670–80.
75. Yamada H, Suzuki K, Ichino N, Ando Y, Sawada A, Osakabe K, et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin Chim Acta [Internet].* 2013;424:99–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.021>
76. Lavanya RL, Av SS, K PC, M RR, F AT. Circulating miRNA-33: a potential biomarker in patients with coronary artery disease. *Biomarkers [Internet].* 2019;24(1):36–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1354750X.2018.1501760>
77. Willeit P, Skrobilin P, Kiechl S, Ferna C, Mayr M. Liver microRNAs : potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease ? *Eur Soc Cardiol.* 2016;37(43):3260–6.
78. Wu J, Song J, Wang C, Niu D, Li H, Liu Y, et al. Identification of serum microRNAs for cardiovascular risk stratification in dyslipidemia subjects. *Int J Cardiol.* 2014;172(1):232–4.
79. Li C, Fang Z, Jiang T, Zhang Q, Liu C, Zhang C, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics.* 2013;6(16).

80. Alvares-da-silva MR, Pinto C, Souza M, Stefano JT, Barbeiro H V, Barbeiro D, et al. Pro-atherosclerotic markers and cardiovascular risk factors one year after liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2014;20(26):8667–73.
81. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(5):1516–21.
82. Tana C, Ballestri S, Ricci F, Vincenzo A Di, Ticinesi A, Gallina S, et al. Cardiovascular Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;56(3):243–5.
83. Deprince A, Haas JT, Staels B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol Metab* [Internet]. 2020;101092. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101092>
84. Borges-canha M, Neves JS, Libânio D, Catarina MV, Ana MA, Leite R, et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiac function and structure — a meta-analysis. *Endocrine* [Internet]. 2019;66(3):467–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-019-02070-0>
85. Ghoneim S, Dhorepatil A, Shah AR, Ram G, Ahmad S, Kim C, et al. Non-alcoholic steatohepatitis and the risk of myocardial infarction: A population-based national study. *World J Hepatol*. 2020;12(7):378–88.
86. Health N, Westmead DR. Prothrombotic Factors and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Additional Link to Cardiovascular Risk? *Hepatology*. 2014;59(1):16–8.
87. Kasper P, Martin A, Lang S, Kütting F, Goeser T, Demir M, et al. NAFLD and

- cardiovascular diseases : a clinical review. *Clin Res Cardiol* [Internet]. 2020;  
Available from: <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01709-7>
88. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley K V., McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675–85.
  89. Xu R, Tao A, Zhang S, Deng Y, Chen G. Association between vitamin E and non-alcoholic steatohepatitis : a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3924–34.
  90. Trupp M, Zhu H, Wikoff WR, Baillie RA, Zeng Z, Karp PD, et al. Metabolomics Reveals Amino Acids Contribute to Variation in Response to Simvastatin Treatment. *PLoS One*. 2012;7(7):1–9.
  91. Europeia A, Easl F, Europeia A. Normas de Orientação Clínica da EASL , EASD e EASO sobre a abordagem da doença hepática não alcoólica. *J Hepatol*. 2016;64:1388–402.
  92. Attia SL, Softic S, Mouzaki M. Evolving Role for Pharmacotherapy in NAFLD / NASH. *Clin Transl Sci*. 2020;0:1–9.
  93. Connelly MA, Velez J, John R, Shadab M, Arun S. Review article : The impact of liver-directed therapies on the atherogenic risk profile in non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;(March):1–18.
  94. ET G, CS S, SS S, H V, LL G, MY M. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis (Review). *Cochrane*. 2018;

95. Canbay A, Sowa J. L-Ornithine L-Aspartate ( LOLA ) as a Novel Approach for Therapy of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Drugs* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1020-5>
96. Najmi AK, Pillai KK, Pal SN, Akhtar M, Aqil M, Sharma M. Effect of l-ornithine l-aspartate against thioacetamide-induced hepatic damage in rats. *Indian J Pharmacol*. 2010;42(6):384–347.
97. Alvares-da-silva MR, Araujo A De, Vicenzi JR, Veber G, Oliveira FB, Schacher F, et al. Oral l-ornithine-l-aspartate in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatol Res*. 2014;44:956–63.
98. Fernandes Cruzat V, Petry ER, Tirapegui J. Glutamina : Aspectos Bioquímicos , Metabólicos , Moleculares e Suplementação. *Rev Bras Med Esporte*. 2009;15(3):392–7.
99. Holecek M. Why Are Branched-Chain Amino Acids Increased in Starvation and Diabetes? *Nutrients*. 2020;12(10):13–6.
100. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. ARGINASE : A MULTIFACETED ENZYME IMPORTANT IN HEALTH AND DISEASE. *Physiol Rev*. 2018;98(2):641–65.
101. Cylwik D, Mogielnicki A, Buczko W. L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacol Rep*. 2005;57(1):14–22.
102. Kircheis G, Lüth S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of L-Ornithine L-Aspartate ( LOLA ) in Hepatic Encephalopathy. *Drugs* [Internet].

2019;79(s1):23–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1023-2>

103. Jegatheesan P, Ventura G, Nubret E, Sarfati G. Citrulline and Nonessential Amino Acids Prevent Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *J Nutr Dis.* 2015;145(10):2273–9.
104. Oseini AM, Cole BK, Issa D, Feaver RE, Sanyal AJ. Translating scientific discovery : the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int [Internet].* 2018;6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9838-6>
105. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A preclinical mouse model of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular cancer that mimics human disease. *J Hepatol [Internet].* 2016;65(3):579–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>
106. Starter DA, Herck MA Van. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver. *Nutrients.* 2017;9:1–13.
107. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH : Getting both pathology and metabolic context right. 2008;23:1635–48.
108. Silva EP da. Modelo experimental para indução da esteatose hepática e esteatohepatite : estudo em ratos Dissertação apresentada à Faculdade de São Paulo. Fac Med da Univ São Paulo. 2012;
109. Longo L, Tonin Ferrari J, Rampelotto PH, Hirata Dellavia G, Paqualotto A, Oliveira C, et al. Gut Dysbiosis and Increased Intestinal Permeability Drive microRNAs , NLRP-3 Inflammasome and Liver Fibrosis in a Nutritional Model

of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Adult Male Sprague Dawley Rats. Clin Exp Gastroenterol. 2020;13:351–68.