



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DOENÇA ESTEATÓTICA NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO:
COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS
ENTRE MODELO MURINO E PACIENTES OBESOS**

LUANA CARNEIRO PALMA

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia

**DOENÇA ESTEATÓTICA NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO:
COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS
ENTRE MODELO MURINO E PACIENTES OBESOS**

Luana Carneiro Palma

Orientadora: Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

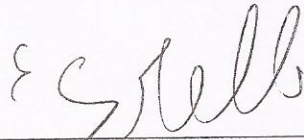
**Salvador – Bahia – Brasil
2012**

" DOENÇA ESTEATÓTICA NÃO ALCÓOLICA DO FÍGADO: COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS ENTRE MODELO MURINO E PACIENTES OBESOS "

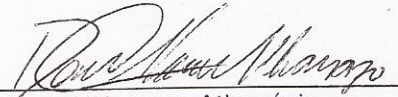
LUANA CARNEIRO PALMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

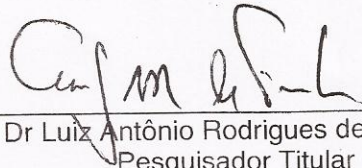
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Evandro Sobroza de Mello
Médico da Divisão de Anatomia
Patológica
USP



Dr. Daniel Abensur Athanázio
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

*Aos meus pais, Carlos e Conceição, e ao meu marido Robson
pelo amor, força e apoio incondicionais.
Sem vocês nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Conceição, pelo amor e apoio incondicionais;

Ao meu marido Robson pelo amor, companheirismo e apoio constantes;

A Dra. Patrícia Veras pelos anos de orientação dedicada e criteriosa, e por mostrar o verdadeiro sentido da ciência;

A Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas pela orientação e entusiasmo constantes;

A Dra. Milena Soares, Alice Kiperstok, Juliana Freitas e Mariana Gouveia pela disponibilização do material de estudo;

A Dr. Washington Conrado dos Santos pela disponibilidade e atenção;

A Dayana Reuter e Cátia Boechat pelo auxílio nas imunomarcações do material humano;

A todos os amigos do LPBI pela amizade e pelos anos de convivência cheios de alegria;

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento das atividades;

A todos os meus familiares e amigos pela força e pelas orações;

Aos meus amigos da Pós-graduação em Patologia Humana pelo convívio cheio de alegria;

A CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1. Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado.....	11
1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da NAFLD.....	13
1.2.1. Obesidade.....	13
1.2.2. Resistência à insulina.....	14
1.2.3. Exposição ocupacional.....	15
1.3. Metabolismo lipídico durante a NAFLD.....	16
1.4. Alterações histológicas hepáticas da NAFLD.....	17
1.4.1. Esteatose.....	17
1.4.2. Balonização hepatocelular.....	17
1.4.3. Corpúsculos de Mallory-Denk.....	18
1.4.4. Inflamação.....	18
1.4.5. Fibrose.....	20
1.5. Mecanismos de progressão da NAFLD.....	21
1.6. Modelos animais da NAFLD.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Amostras hepáticas humanas.....	27
4.2. Amostras hepáticas murinas.....	27
4.3. Avaliação das alterações histológicas hepáticas.....	28
4.4. Imunoistoquímica.....	29
4.4.1. Material humano.....	29
4.4.2. Material murino.....	30
4.5. Análises semi-quantitativas das alterações hepáticas e das imunomarcações, e estatísticas.....	32
4.6. Considerações éticas.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Modelo murino.....	34
5.1.1. Esteatose macrovacuolar.....	34
5.1.2. Esteatose microvacuolar.....	34
5.1.3. Balonização hepatocelular.....	35

5.1.4.	Corpúsculos de Mallory-Denk.....	35
5.1.5.	Inflamação lobular.....	35
5.1.6.	Inflamação portal.....	35
5.1.7.	Fibrose perissinusoidal	36
5.1.8.	Fibrose portal.....	36
5.1.9.	Fibrose septal.....	36
5.1.10.	Presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em modelo murino de NAFLD	42
5.2.	Pacientes obesos	48
5.2.1.	Esteatose macrovacuolar	48
5.2.2.	Esteatose microvacuolar	48
5.2.3.	Balonização hepatocelular	48
5.2.4.	Corpúsculos de Mallory-Denk.....	49
5.2.5.	Inflamação lobular.....	49
5.2.6.	Inflamação portal.....	49
5.2.7.	Fibrose perissinusoidal	49
5.2.8.	Fibrose portal.....	50
5.2.9.	Fibrose septal.....	50
5.2.10.	Presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em pacientes obesos	56
6.	RESUMO DOS RESULTADOS	60
7.	DISCUSSÃO.....	62
8.	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações celulares em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.....	39
Figura 2: Inflamação lobular e inflamação portal em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.	40
Figura 3: Fibrose em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.....	41
Figura 4: Expressão de alfa-actina de músculo liso em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.	45
Figura 5: Expressão de desmina em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.....	45
Figura 6: Expressão de citoqueratina 7 em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.....	46
Figura 7: Expressão de citoqueratina 19 em fígados de camundongos alimentados com dieta HF.....	47
Figura 8: Alterações celulares em fígados de pacientes obesos.	53
Figura 9: Inflamação lobular e inflamação portal em fígados de pacientes obesos.	54
Figura 10: Fibrose em fígados de pacientes obesos.....	55
Figura 11: Expressão de alfa-actina de músculo liso em fígados de pacientes obesos..	58
Figura 12: Expressão de desmina em fígados de pacientes obesos.	58
Figura 13: Expressão de citoqueratina 7 em fígados de pacientes obesos.	59
Figura 14: Expressão de citoqueratina 19 em fígados de pacientes obesos.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados em imunistoquímicas de tecido murino e tecido humano.....	32
Tabela 2: Alterações hepáticas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle.....	37
Tabela 3: Intensidade das alterações hepáticas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle.....	38
Tabela 4: Imunomarcações em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle.....	44
Tabela 5: Intensidade das imunomarcações em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle.....	44
Tabela 6: Alterações hepáticas em fígados de pacientes obesos.....	51
Tabela 7: Intensidade das alterações hepáticas em fígados de pacientes obesos.....	52
Tabela 8: Imunomarcações em fígados de pacientes obesos.....	57
Tabela 9: Intensidade das imunomarcações em fígados de pacientes obesos.....	57
Tabela 10: Presença de alterações hepáticas em camundongos HFD e em pacientes obesos.....	61
Tabela 11: Presença de imunomarcações em fígado de camundongos HFD e em fígado pacientes obesos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CK – Citoqueratina

DAB – 3'diaminobenzidina

4-HNE – 4-hidroxinonenal

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG – Imunoglobulina G

IMC – Índice de Massa Corporal

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP-1 – Proteína 1 quimiotática de monócitos (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein 1*)

NAFLD – Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado (do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH – Esteato-hepatite Não Alcoólica (do inglês *Nonalcoholic Steatohepatitis*)

PBS – Tampão de fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffer Saline*)

TGF- β – Fator de transformação de crescimento (do inglês *Transforming Growth Fator beta*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*)

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês *Very Low Density Lipoprotein*)

RESUMO

DOENÇA ESTEATÓTICA NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO: COMPARAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS ENTRE MODELO MURINO E PACIENTES OBESOS

A Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado (do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* – NAFLD) é uma doença crônica hepática de caráter espectral, que vai desde a esteatose simples até a esteato-hepatite não alcoólica. A progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular têm sido descrita. A NAFLD apresenta aspectos histológicos semelhantes à doença hepática relacionada ao álcool (esteatose, inflamação lobular, corpúsculos de Mallory e fibrose), mas acomete indivíduos com história negativa de consumo excessivo de álcool. A NAFLD é uma das principais doenças crônicas hepáticas mundiais, e os indivíduos obesos representam a maioria dos casos da doença. Os mecanismos envolvidos na progressão da esteatose para esteato-hepatite não são bem compreendidos. Neste aspecto, modelos murinos da NAFLD têm sido frequentemente utilizados para elucidação destes mecanismos. A maioria dos modelos disponíveis é resultante de modificações genéticas e/ou nutricionais e, em geral, não simulam as alterações metabólicas e histológicas comumente vistas em pacientes com NAFLD. Em nosso grupo, foi proposto um novo modelo de NAFLD. Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura (*High Fat* - HF) demonstraram alterações metabólicas e histológicas sugestivas de NAFLD. O objetivo do presente trabalho foi comparar alterações histológicas hepáticas presentes nestes camundongos com as alterações observadas em pacientes obesos. Amostras de fígados de pacientes obesos e de camundongos alimentados com a dieta HF foram utilizadas. Os tecidos hepáticos foram corados em Hematoxilina & Eosina e *Picrosirius Red* para avaliação das alterações hepáticas (esteatose, balonização, inflamação, corpúsculos de Mallory-Denk e fibrose). Além disso, foi realizada imunoistoquímica para avaliação da presença de células estrelares ativadas e de células progenitoras hepáticas, células envolvidas na fibrose e no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, respectivamente. Os resultados demonstraram que os fígados de todos os pacientes obesos exibiram esteatose macrovacuolar, balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose perissinusoidal, o que caracterizou estes pacientes como portadores da NAFLD. As mesmas alterações foram observadas em fígados de camundongos alimentados com a dieta HF. As células estrelares ativadas foram observadas em todos os pacientes obesos, assim como em camundongos de dieta HF. As células progenitoras hepáticas foram observadas na maioria dos pacientes obesos. O fígado de todos os camundongos alimentados com dieta HF exibiram células progenitoras hepáticas. A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que fígados de camundongos alimentados com dieta HF exibem alterações histológicas hepáticas similares às observadas em pacientes obesos. Isto abre perspectivas para a utilização do modelo proposto em estudos que busquem elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese da NAFLD.

Palavras-chave: 1. Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado; 2. Obesidade; 3. Modelo murino; 4. Patogênese

ABSTRACT

Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a chronic liver disease ranging from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis. The progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma has been reported. The NAFLD shows histological features similar to alcohol-related liver disease (steatosis, lobular inflammation, fibrosis and Mallory-Denk bodies), but affects individuals with no history of excessive alcohol consumption. The NAFLD is a major chronic hepatic disease in the world, and obese individuals represent the majority of cases of the disease. The mechanisms involved in the progression of steatosis to steatohepatitis are not well understood. In this regard, murine models of NAFLD have been frequently used for elucidation of these mechanisms. Most available models are the result of genetic or nutritional modifications, and generally do not mimic metabolic and histologic changes commonly seen in patients with NAFLD. In our group, we have proposed a new model of NAFLD. Mice fed high fat diet (HF diet) demonstrated metabolic and histological features suggestive of NAFLD. The aim of this study was to compare liver histological alterations present in these mice with the changes observed in obese patients. Samples of livers of obese patients and mice fed HF diet were used. For assessment of liver alterations, such as steatosis, ballooning, inflammation, Mallory-Denk bodies and fibrosis, tissues were stained with hematoxylin & eosin and picrossirius red. In addition, the presence of activated stellate and progenitor liver cells was estimated using immunohistochemistry. The results show that the livers of all obese patients exhibited macrovesicular steatosis, hepatocellular ballooning, perisinusoidal fibrosis, and lobular inflammation, which characterized these patients with NAFLD. Similar changes were observed in livers of mice that fed the HF diet. Activated stellate cells were observed in all obese patients as well as in mice HF. Hepatic progenitor cells were observed in most obese patients. The liver of all animals fed the HF diet exhibited liver progenitor cells. From the data obtained, it can be concluded that livers of mice fed with HF diet exhibit liver abnormalities similar to those observed in obese patients. This opens perspectives for the use of the proposed model in studies that seek to elucidate the mechanisms involved in the pathogenesis of NAFLD.

Keywords: 1. Nonalcoholic Fatty Liver Disease; 2. Obesity; 3. Murine model; 4. Pathogenesis

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado

A Doença Esteatótica Não Alcoólica do Fígado (do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* - NAFLD) é o termo utilizado para designar a doença crônica hepática de caráter espectral, que vai desde a esteatose simples até a esteato-hepatite. A NAFLD pode progredir para cirrose e é fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. A NAFLD apresenta aspectos histológicos semelhantes à doença hepática relacionada ao álcool, entretanto, acomete indivíduos sem história de consumo abusivo de etanol (MATTEONI *et al.*, 1999; BUGIANESI *et al.*, 2002; CLARK & DIEHL, 2003). A esteato-hepatite não alcoólica (do inglês *Nonalcoholic Steatohepatitis* - NASH), uma das manifestações da NAFLD, foi o termo proposto por LUDWIG e colaboradores (1980) para designar uma nova doença observada principalmente em indivíduos obesos (90%) e do sexo feminino (65%), que não ingeriam quantidade excessiva de álcool. Entretanto, esses indivíduos apresentavam alterações histológicas hepáticas semelhantes à de indivíduos com hepatite alcoólica, tais como: esteatose, inflamação lobular, corpúsculos de Mallory-Denk e fibrose.

A alteração histológica hepática presente em todos os pacientes com NAFLD é a esteatose. Entretanto, alguns pacientes podem evoluir de uma simples esteatose para NASH. Os motivos pelos quais alguns pacientes evoluem para NASH e outros não, ainda não são compreendidos. Quando os pacientes exibem NASH, as principais alterações observadas são a lesão hepatocelular (representada principalmente pela balonização hepatocelular, mas pode ser representada por apoptose ou necrose lítica) e a inflamação. Entretanto, pode-se observar também a fibrose e corpúsculos de Mallory-Denk (LUDWIG *et al.*, 1980; BACON *et al.*, 1994; MATTEONI *et al.*, 1999).

Em geral, pacientes com NAFLD são assintomáticos. Os sintomas, quando presentes, são inespecíficos e brandos como fadiga e desconforto abdominal no quadrante superior direito (SANYAL, 2002). Com isso, o indicativo inicial da presença de doença hepática, geralmente, ocorre na avaliação de exames laboratoriais de rotina, como níveis séricos elevados das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que são marcadores de

lesão hepatocelular (GREEN & FLAMM, 2002). Com a exclusão da presença de outras doenças hepáticas como hepatites virais, doenças autoimunes hepáticas e da exclusão de ingestão alcoólica excessiva, permite-se sugerir a presença da NAFLD (SCHREUDER *et al.*, 2008). Exames de imagem, como o ultrassom, permitem a avaliação do conteúdo de gordura hepática, e de acordo com a *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD), quando este conteúdo ultrapassa 5% a 10% do peso do fígado, considera-se presença da NAFLD (NEUSCHWANDER-TETRI & CALDWELL, 2003). Mas, apesar de todas essas abordagens, a biópsia hepática é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da NAFLD. O critério histológico mínimo para o diagnóstico de NAFLD é a presença de esteatose em mais de 5% dos hepatócitos em um corte histológico. Para o diagnóstico de NASH, o critério histológico utilizado é a presença de esteatose, lesão hepatocelular e inflamação lobular. A fibrose não é uma alteração requerida para o diagnóstico de NASH, mas sua presença é um indicador de doença com risco de progressão para estágios mais avançados (BRUNT, 2001; TINIAKOS *et al.*, 2010).

Atualmente, nos Estados Unidos, a prevalência da NAFLD é de 11,01%, o dobro da prevalência observada em 1988, que era de 5,51%. Além disso, a NAFLD é apontada como sendo a responsável por 75,01% dos casos de doenças crônicas hepáticas no país (YOUNOSSI *et al.*, 2011). Estudos de prevalência da NAFLD também foram realizados em outros países. No Japão, a prevalência da NAFLD é de 9,3% (SUZUKI *et al.*, 2005). Tais estudos foram conduzidos na população geral e, utilizaram como definição de NAFLD, a presença de níveis séricos elevados de aminotransferases em indivíduos com história negativa de álcool e de hepatites B e C. A prevalência da NAFLD observada em populações de risco, como obesos mórbidos, aumenta substancialmente. Nos Estados Unidos, a prevalência de NAFLD foi de 86% em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica. Dentre os indivíduos com NAFLD, 36% exibiram NASH (GHOLAM *et al.*, 2007). No Brasil, um estudo conduzido com 112 indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica demonstrou prevalência da NAFLD de 99,1%. Destes, 57,7% exibiram NASH (LIMA *et al.*, 2005). Estes estudos utilizaram biópsias hepáticas para o diagnóstico da NAFLD.

1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da NAFLD

1.2.1. Obesidade

A obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da NAFLD. Devido ao aumento crescente do número de indivíduos obesos, estima-se que a NAFLD se torne a doença crônica hepática mais frequente no mundo (LAZO & CLARK, 2008). A obesidade é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso de gordura corporal, resultante da ingestão calórica maior do que a necessária para suprir a demanda energética do corpo. A obesidade é influenciada por fatores genéticos e, principalmente, por fatores ambientais. Atualmente, as mudanças de hábitos alimentares, com o aumento da ingestão de alimentos ricos em gorduras e carboidratos, e a redução de atividades físicas no cotidiano, contribuem para o desenvolvimento da obesidade (KLEIN *et al.*, 2002).

De acordo com o *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines on Obesity*, indivíduos que exibem Índice de Massa Corporal (IMC, cálculo do peso dividido pelo quadrado da altura do indivíduo) igual ou superior a 25Kg/m² são considerados indivíduos com sobrepeso e aqueles com IMC igual ou superior a 30Kg/m² são considerados obesos (MATHUS-VLIEGEN *et al.*, 2012). Dados da Organização Mundial de Saúde apontam que, de 1980 a 2008, a prevalência mundial da obesidade mais que duplicou. Globalmente, em 2008, 35% dos adultos a partir dos 20 anos de idade apresentavam sobrepeso e 12% apresentavam obesidade (WHO, 2012a). O aumento de peso corporal também tem atingido as crianças. Em 2010, mais de 40 milhões de crianças menores de 5 anos apresentavam sobrepeso (WHO, 2012b). No Brasil, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares feita pelo IBGE entre 2008 e 2009, a prevalência de sobrepeso foi de 49% e da obesidade foi de 14,8% na população com idade igual ou superior a 20 anos (IBGE, 2010).

O desenvolvimento da NAFLD em indivíduos obesos tem sido descrito (ADLER & SCHAFFNER, 1979; GARCIA-MONZÓN *et al.*, 2000; DIXON *et al.*, 2001). ADLER & SCHAFFNER (1979), em um estudo conduzido com 29 pacientes obesos, demonstraram a presença de NAFLD em todos os indivíduos, alguns exibindo formas mais graves da doença como a NASH ou, até mesmo, a cirrose hepática. A progressão para as formas mais graves da NAFLD em indivíduos obesos está

associada a variáveis como idade, maior intensidade de esteatose e de inflamação (GARCIA-MONZÓN *et al.*, 2000). Em estudo conduzido com 315 pacientes, a NASH foi observada em 18,5% dos indivíduos obesos submetidos à autópsia (WANLESS & LENTZ, 1990).

1.2.2. Resistência à insulina

Uma das principais consequências metabólicas da obesidade é a resistência à insulina, condição que está associada ao acúmulo de triglicerídeos no hepatócito (BROWNING & HORTON, 2004). A insulina é um hormônio secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas e responsável pela manutenção da homeostase da glicose, regulando sua produção hepática e sua captação periférica nos tecidos, principalmente, o muscular e o adiposo (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). A resistência à insulina é uma condição na qual concentrações normais de insulina são incapazes de induzir efeitos no metabolismo da glicose, e, como consequência, há uma maior secreção de insulina pelas células β pancreáticas para que os efeitos normais sejam realizados, resultando em hiperinsulinismo (EL-ZAYADI, 2008). Os altos níveis de insulina circulantes estimulam a lipogênese no fígado a partir da ativação de genes que codificam as enzimas que participam da síntese *de novo* de ácidos graxos: *acetyl CoA carboxylase* (ACC), *fatty acid synthase* (FASN) e *stearoyl-CoA desaturase 1* (SCD1). A ativação desses genes é mediada pelo fator de transcrição *sterol regulatory element - binding protein - 1c* (SREBP - 1c) (FORETZ *et al.*, 1999; HORTON *et al.*, 2002).

A resistência à insulina também leva ao aumento da produção de glicose hepática (LAM *et al.*, 2003). Os altos níveis de glicose estimulam a lipogênese, a qual é mediada pelo fator de transcrição *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP). O ChREBP se liga ao promotor do gene que codifica a *liver-type pyruvate kinase* (L-PK), enzima que regula a glicólise e catalisa a formação de piruvato. O piruvato formado é direcionado para a síntese de ácidos graxos, favorecendo o acúmulo de gordura hepática (YAMASHITA *et al.*, 2001; KAWAGUCHI *et al.*, 2002).

Pacientes com NAFLD apresentam redução da sensibilidade à insulina, desenvolvendo resistência a este hormônio (MARCHESINI *et al.*, 2001). CHITTURI e

colaboradores (2002) demonstraram que 65 (98%) de 66 pacientes portadores de NASH apresentavam resistência à insulina. Além disso, a prevalência de resistência à insulina foi significativamente maior em pacientes com NASH (75%) do que em pacientes com hepatite C (8,3%), sugerindo uma associação clara entre resistência à insulina e NASH.

1.2.3. Exposição ocupacional

A NAFLD também está associada à exposição ocupacional. COTRIM e colaboradores (1999) demonstraram que trabalhadores da indústria petroquímica, não portadores de síndrome metabólica, cronicamente expostos a substâncias voláteis como benzeno, etileno, xileno, dimetilformamida, entre outros, desenvolveram NASH. Em um estudo, alterações hepáticas foram investigadas em sete trabalhadores expostos de forma variada ao solvente dimetilformamida em uma fábrica de tecidos. Tanto trabalhadores que foram expostos por curto período de tempo (menos de 3 meses), quanto aqueles expostos por longo tempo (1 a 10 anos), desenvolveram esteatose e lesão hepatocelular (REDLICH *et al.*, 1990). Trabalhadores expostos a solventes orgânicos, como o xileno e o tolueno, também desenvolveram esteatose e necrose, e parte deles exibiu fibrose (DOSSING *et al.*, 1983). Recentemente, COTRIM e colaboradores (2004) realizaram um estudo que comparou os aspectos histológicos de fígados de dois grupos de trabalhadores expostos a químicos, sendo que apenas um dos grupos apresentava diagnóstico adicional de alguma condição metabólica (obesidade, hiperlipidemia e diabetes). O aspecto histológico dos dois grupos de indivíduos mostrava esteato-hepatite (esteatose, inflamação e balonização hepatocelular), sugerindo que a exposição ocupacional a químicos é um fator de risco para o desenvolvimento de NASH. O estudo também mostrou que quando os trabalhadores eram afastados da exposição, normalizavam os testes hepáticos bioquímicos e histológicos.

1.3. Metabolismo lipídico durante a NAFLD

O acúmulo de gordura no fígado, representado principalmente por triglicerídeos, é resultante de anormalidades do metabolismo lipídico. O acúmulo de triglicerídeos no hepatócito (esteatose) se deve, principalmente, a: 1) excesso de ingestão calórica, 2) aumento da síntese de ácidos graxos durante a lipogênese *de novo*, 3) influxo de ácidos graxos provenientes da lipólise do tecido adiposo e consequente conversão em triglicerídeos, 4) diminuição da exportação de lipídios do fígado e 5) diminuição da oxidação de ácidos graxos (CHEUNG & SANYAL, 2008).

Os triglicerídeos estocados no tecido adiposo são hidrolisados, a partir da atividade de lipases, para formar os ácidos graxos livres (VAUGHAN *et al.*, 1964). Estes ácidos graxos, ligados à albumina, são transportados para ao fígado através da circulação sanguínea (BERK & STUMP, 1999). No fígado, estes ácidos graxos podem ser oxidados a partir da β -oxidação mitocondrial para formação de ATP ou esterificados em triglicerídeos, os quais podem ser estocados no hepatócito ou incorporados a partículas de VLDL (*very low density lipoprotein*) para exportação (EL ZAYADI, 2008). Em indivíduos obesos e resistentes à insulina ocorre o aumento da atividade da lipase sensível a hormônio, enzima que é regulada pela insulina e é a principal responsável pela liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. Este evento resulta em maior hidrólise de triglicerídeos do tecido adiposo, que aumenta os níveis de ácidos graxos circulantes e, conseqüentemente, aumenta a captura de ácidos graxos pelo fígado (LEWIS *et al.*, 2002). Outro aspecto importante para o desenvolvimento da esteatose é que, em situações de excesso de glicose, a glicose é convertida em ácidos graxos. O piruvato, resultante da quebra da glicose, é conduzido para o ciclo de Krebs para gerar o citrato. O citrato é utilizado para formação de acetil coenzima A, que direciona a síntese de ácidos graxos (MASORO *et al.*, 1950). Além disso, como citado anteriormente, a participação da insulina e da glicose (mediada pelos fatores de transcrição SREBP-1c e ChREBP, respectivamente) na ativação da síntese *de novo* de ácidos graxos, facilitam o acúmulo de triglicerídeos no hepatócito (ver tópico Resistência à insulina).

1.4. Alterações histológicas hepáticas da NAFLD

1.4.1. Esteatose

A esteatose macrovacuolar é representada por hepatócitos contendo um grande e único vacúolo de gordura que desloca o núcleo da célula, do centro para a periferia. A esteatose macrovacuolar é a mais comum na NAFLD e quando não está acompanhada de outras alterações hepáticas, geralmente, não resulta em progressão para formas mais graves da doença (MATTEONI *et al.*, 1999). A esteatose microvacuolar é representada por hepatócitos contendo inúmeros e pequenos vacúolos de gordura. Neste caso, o núcleo se mantém no centro da célula. Este tipo de esteatose está relacionado ao prejuízo da β -oxidação mitocondrial hepática de ácidos graxos (FROMENTY *et al.*, 1997). Não é tão comum quanto à esteatose macrovacuolar, mas, quando presente, a esteatose microvacuolar está associada a um estágio mais avançado da doença, com presença de balonização, inflamação e fibrose (TANDRA *et al.*, 2011). A esteatose é mais comum na zona 3 do ácino hepático, entretanto, se a esteatose for mais intensa, esta alteração pode ocupar todo o ácino hepático (BRUNT & TINIAKOS, 2010). Interessantemente, a esteatose em crianças com NAFLD é comum na zona 1 do ácino hepático (SCHWIMMER *et al.*, 2005).

1.4.2. Balonização hepatocelular

A balonização hepatocelular é uma degeneração celular representada por hepatócitos distendidos, que exibem tamanho até duas vezes maior que o hepatócito normal, e que apresentam citoplasma claro, com aspecto de baixa densidade (TINIAKOS, 2010). Esta alteração morfológica observada nos hepatócitos balonizados está relacionada a alterações em proteínas presentes nos filamentos intermediários do citoesqueleto, principalmente nas citoqueratinas 8 e 18, que são as citoqueratinas expressas em hepatócitos diferenciados (MOLL *et al.*, 1982; ZATLOUKAL *et al.*, 2004; LACKNER *et al.*, 2008). Em estudo recente foi demonstrado que os hepatócitos balonizados na NASH exibem inúmeras gotículas de gordura, retículo endoplasmático e mitocôndrias dilatados (com mitocôndrias exibindo inclusões cristalinas) e corpúsculos de Mallory-Denk (CALDWELL *et al.*,

2010). A presença da balonização hepatocelular está associada a formas mais graves da NAFLD e se associa à fibrose e ao desenvolvimento de cirrose (MATTEONI *et al.*, 1999). Os hepatócitos balonizados se localizam, principalmente, na zona 3 do ácino hepático, próximos aos hepatócitos esteatóticos (BRUNT, 2009).

1.4.3. Corpúsculos de Mallory-Denk

Os corpúsculos de Mallory-Denk são inclusões hialinas citoplasmáticas presentes no hepatócito, visualizadas na coloração Hematoxilina & Eosina (H&E) como agregados eosinofílicos (DENK *et al.*, 2000). São constituídos, principalmente, por queratinas, chaperonas e por proteínas envolvidas em processos de degradação protéica. Dentre as queratinas, as queratinas 8 e 18 são as mais presentes nos corpúsculos de Mallory-Denk (DENK *et al.*, 1982; PEI *et al.*, 2004). As proteínas de degradação mais comuns são a ubiquitina e a p62 (ZATLOUKAL *et al.*, 2002). Ultraestruturalmente, os corpúsculos de Mallory-Denk exibem filamentos orientados aleatoriamente, os quais apresentam 175 a 250 nm de comprimento e 14 a 20 nm de espessura (FRANKE *et al.*, 1979). Evidências sugerem que a formação dos corpúsculos de Mallory-Denk é desencadeada a partir de algum estresse sofrido pela célula, por exemplo, o estresse oxidativo. Este estresse leva à superexpressão das queratinas 8 e 18, com subsequente ubiquitinação e transamidação da queratina, formando complexos de alto peso molecular. Aliado a isso, deficiências em sistemas de degradação protéica, via proteassoma e/ou via autofágica, facilitam a formação destes agregados protéicos (ZATLOUKAL *et al.*, 2007).

1.4.4. Inflamação

A inflamação hepática durante a NAFLD pode ser desencadeada por vários fatores. O estresse oxidativo é o fator que mais tem sido relacionado ao desenvolvimento da inflamação (KOEK *et al.*, 2011). Uma fonte importante de formação de radicais de oxigênio no fígado é a mitocôndria, a partir do desvio de elétrons da cadeia respiratória durante a β -oxidação de ácidos graxos. Estes elétrons reagem com moléculas de oxigênio, resultando na formação de superóxido (O_2^-) (PESSAYRE, 2007). Outro fator possivelmente implicado na iniciação dos

processos inflamatórios é a lipotoxicidade. A lipotoxicidade é o termo utilizado para designar a lesão ou morte celular causada pelos ácidos graxos livres e seus metabólitos. Os triglicerídeos são os lipídios acumulados em maior quantidade no fígado de pacientes com NAFLD (PURI *et al.*, 2007). Entretanto, alguns estudos sugerem que o acúmulo de triglicerídeos pode atuar como um mecanismo protetor do hepatócito. Yamaguchi e colaboradores (2007) demonstraram que a inibição da diacilglicerol aciltransferase 2 (enzima que catalisa o último passo da síntese de triglicerídeos), em um modelo murino da NAFLD, reduz a esteatose hepática, mas aumenta os níveis hepáticos de ácidos graxos livres e intensifica a inflamação e a fibrose. Estes ácidos graxos livres e seus metabólitos, como o diacilglicerídeo, o colesterol livre e a ceramida podem ser tóxicos para o hepatócito e, assim, iniciarem o processo inflamatório (NEUSCHWANDER-TETRI, 2010). Fatores externos também podem influenciar no desenvolvimento da inflamação hepática. O tecido adiposo visceral, considerado órgão endócrino ativo e que em indivíduos com NAFLD apresenta maior volume, libera citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que tem sido relacionado ao desenvolvimento da inflamação hepática (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; FAIN *et al.*, 2004; STANTON *et al.*, 2011). Os níveis séricos de TNF- α , assim como da proteína 1 quimiotática de macrófago (MCP-1), foram mais elevados em pacientes com NASH do que em pacientes que só apresentavam esteatose (HAUKELAND *et al.*, 2006). Outro fator sistêmico que pode influenciar na inflamação hepática é a liberação de endotoxinas (lipopolissacarídeos – LPS) derivadas do intestino. Indivíduos com NAFLD exibem maior permeabilidade intestinal e isso faz com que a endotoxina atinja a circulação portal hepática e induza inflamação (MIELE *et al.*, 2009). WIGG e colaboradores (2001) mostraram que pacientes com NASH apresentavam abundante crescimento de bactérias no intestino delgado quando comparados com pacientes sem história de doença hepática. Independente do fator que inicia os processos inflamatórios, as vias de sinalização que ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a quinase c-Jun-N terminal (JNK) são as vias mais comuns nas respostas pró-inflamatórias durante a NASH, resultando na expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (DELA PEÑA *et al.*, 2005; SCHATTEBERG *et al.*, 2006; VIDELA *et al.*, 2009). Na NAFLD, a inflamação lobular é a mais comum e consiste de infiltrado inflamatório misto, composto, principalmente, por linfócitos, e em menor proporção por

eosinófilos e neutrófilos. A inflamação portal pode estar presente, e neste caso é mononuclear, composta por linfócitos (BRUNT & TINIAKOS, 2010).

1.4.5. Fibrose

A fibrose hepática é uma consequência aos danos crônicos sofridos pelo fígado, que se inicia quando os processos reparativos, como a regeneração hepática, falham e os hepatócitos são substituídos pela matriz extracelular (LI & FRIEDMAN, 1999). A fibrose hepática consiste no aumento da deposição da matriz extracelular, principalmente de colágeno, pelas células estelares hepáticas ativadas (FRIEDMAN *et al.*, 1985; MAHER *et al.*, 1988). Além das células estelares ativadas, estudos mostram que outras células podem estar envolvidas na fibrogênese hepática como hepatócitos e colangiócitos (após sofrerem o processo de transição epitélio-mesênquima e se transformarem em miofibroblastos), fibroblastos portais e fibrócitos derivados da medula óssea (TUCHWEBER *et al.*, 1996; KISSELEVA *et al.*, 2006; KAIMORI *et al.*, 2007). A transição epitélio-mesênquima é o processo pelo qual células epiteliais adquirem características fenotípicas e funcionais de células mesenquimais, consistindo, principalmente, na perda da adesão e da polaridade celular e no aumento da mobilidade celular (LEE *et al.*, 2006). A ativação das células estelares hepáticas pode ser desencadeada por alguns fatores. Espécies reativas de oxigênio, liberadas por hepatócitos lesados, ativam células estelares e resultam na síntese e deposição de colágeno por estas células (LEE *et al.*, 1995; SVEGLIATI-BARONI *et al.*, 1998). O fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) participa da fibrogênese hepática e também ativa miofibroblastos a produzirem matriz extracelular (QI *et al.*, 1999; GEORGE *et al.*, 1999).

Na NAFLD, a fibrose hepática se inicia na zona 3 do ácino hepático, ao longo dos sinusóides e contornando os hepatócitos (YEH & BRUNT, 2007). Se os danos ao fígado persistem, ocorre o aumento de deposição de colágeno que pode resultar no desenvolvimento de cirrose. A maioria dos pacientes que exibem cirrose criptogênica apresentam fatores de risco para a NAFLD, como obesidade e resistência à insulina (CALDWELL *et al.*, 1999). A cirrose é caracterizada pela deposição excessiva de colágeno, formando cicatrizes fibróticas que desorganizam a arquitetura hepática. A cirrose resulta em insuficiência hepática e hipertensão

portal e é o principal fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (LLOVET *et al.*, 2003). A origem do carcinoma hepatocelular envolve a proliferação de células progenitoras hepáticas (ROSKAMS, 2006). Estudos sugerem que a ativação destas células durante a NAFLD aumenta o risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (ROSKAMS *et al.*, 2003).

1.5. Mecanismos de progressão da NAFLD

Os mecanismos que promovem a progressão da esteatose simples a esteato-hepatite no fígado gordo ainda não são bem compreendidos. A hipótese mais aceita, até o momento, é que a esteato-hepatite seja a consequência de dois golpes metabólicos (*two hits*). O primeiro golpe é o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos, resultando em esteatose, e o segundo golpe é a produção de radicais livres resultante do estresse oxidativo, tendo como consequência final a peroxidação de lipídios (DAY & JAMES, 1998). Durante a peroxidação de lipídios, vários aldeídos são formados, entre eles o 4-hidroxinonal (HNE) e o malondialdeído (MDA) (CATALÁ, 2009). Evidências sustentam a relação entre a peroxidação de lipídios e o desenvolvimento de algumas alterações histológicas observadas na esteato-hepatite. Foi evidenciado que produtos da peroxidação de lipídios, como o 4-hidroxinonal e o malondialdeído, estão envolvidos nesses processos (LEE *et al.*, 1995; PAROLA *et al.*, 1993; CURZIO *et al.*, 1985; LETTERON *et al.*, 1996). O malondialdeído estimula a ativação de células estrelares hepáticas, que é a célula produtora de colágeno no fígado, resultando em maior expressão de colágeno tipo I e favorecimento do desenvolvimento de fibrose hepática (LEE *et al.*, 1995; FRIEDMAN *et al.*, 1985). Quando células estrelares hepáticas humanas foram tratadas com 4-hidroxinonal, observou-se que houve aumento significativo da expressão gênica e síntese de pro-colágeno tipo I (PAROLA *et al.*, 1993). Tais dados sugerem que a peroxidação de lipídios tem papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática. Alguns estudos sugerem que há relação entre peroxidação de lipídios e inflamação. Foi demonstrado que o 4-hidroxinonal estimula a quimiotaxia de neutrófilos, e o malondialdeído favorece a ativação do NF- κ B, que regula a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a interleucina 8 (IL-8) (CURZIO *et al.*, 1985; BAEUERLE & HENKEL, 1994;

JAESCHKE *et al.*, 1996). LETTERON e colaboradores (1996) sugeriram também que o malondialdeído poderia contribuir para a formação dos corpúsculos de Mallory.

Como citado anteriormente, fatores como a lipotoxicidade, a exposição à endotoxinas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo também podem desencadear a progressão da esteatose simples para a esteato-hepatite (ver tópico Inflamação). Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para que os mecanismos envolvidos nesta progressão sejam completamente elucidados.

1.6. Modelos animais da NAFLD

Os modelos animais são de extrema importância para a elucidação da patogênese das doenças humanas. Inúmeros modelos animais da NAFLD têm sido frequentemente utilizados, os quais podem ser resultantes de modificações genéticas espontâneas ou induzidas, de modificações nutricionais ou da combinação de fatores genéticos com fatores nutricionais (COOK *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2005; WORTHAM *et al.*, 2008). Os modelos mais utilizados são: (a) camundongos *ob/ob*, (b) camundongos *db/db*, (c) camundongos alimentados com dieta deficiente em metionina e colina e (d) camundongos alimentados com dietas ricas em gordura.

Camundongos *ob/ob*, por exemplo, são resultantes de uma mutação espontânea no gene que codifica a leptina (gene *ob*), gerando camundongos deficientes nesta adipocina (proteína que é sintetizada e secretada pelo tecido adiposo). A leptina é secretada pelo tecido adiposo e atua no hipotálamo, mais especificamente no núcleo mediano ventral, controlando a ingestão calórica. A mutação *ob* ocorre no gene da leptina, localizado no cromossomo 6 (FRIEDMAN *et al.*, 1991; ZHANG *et al.*, 1994). Esta mutação leva ao desenvolvimento de animais de grande ingestão calórica, obesos, diabéticos, com hiperinsulinemia e hiperglicemia, os quais desenvolvem esteatose espontaneamente (KOTEISH & DIEHL, 2002). Entretanto, para o desenvolvimento da NASH, estes animais necessitam de um segundo “*hit*” como, por exemplo, a exposição a baixas doses de LPS (YANG *et al.*, 1997). Além disso, devido à ausência da leptina, estes animais não desenvolvem fibrose. A leptina se mostrou importante para a produção do TGF- β 1, que é uma citocina fibrogênica (LECLERCQ *et al.*, 2002).

Por outro lado, camundongos *db/db* são animais resistentes à leptina. Isto ocorre devido a mutação espontânea no gene *db* que codifica o receptor para leptina. A mutação *db* ocorre no cromossomo 4 (TARTAGLIA *et al.*, 1995). Assim como os camundongos *ob/ob*, os camundongos *db/db* são obesos, apresentam resistência a insulina e desenvolvem esteatose espontaneamente. Estes animais desenvolvem NASH quando ingerem dieta deficiente em metionina e colina, que neste caso, atua como um segundo “*hit*” (WORTHAM *et al.*, 2008).

Um outro modelo murino da NAFLD são os camundongos *knockout* para a enzima acil-coenzima A oxidase ($AOX^{-/-}$), enzima que participa da β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia longa. Estes animais desenvolvem NAFLD devido ao acúmulo de gordura gerado pela β -oxidação prejudicada (FAN & QIAO, 2009). Estudos demonstram que a partir dos sete dias de vida, o fígado dos camundongos $AOX^{-/-}$ já apresentam esteatose, que se intensifica aos dois meses de idade (COOK *et al.*, 2001). Entretanto, quando completam de 6 a 8 meses de idade, o fígado destes camundongos exibe reversão da esteatose a partir da regeneração dos hepatócitos. Além disso, exibem retardo de crescimento (FAN *et al.*, 1998).

Camundongos submetidos à inativação somática (específica para hepatócitos) do gene que codifica o fator respiratório nuclear 1 (Nrf1LKO) também têm sido sugeridos como modelos da NAFLD. O fator respiratório nuclear 1 é um fator de transcrição que regula a ativação de genes relacionados à resposta antioxidante (KWONG *et al.*, 1999). Com quatro semanas de vida, camundongos Nrf1LKO apresentam esteatose, necrose e inflamação e aos seis meses observa-se no fígado desses animais fibrose pericelular (XU *et al.*, 2005). Entretanto, estes animais não desenvolvem obesidade.

Modelos de camundongos que desenvolvem NAFLD em decorrência de dieta vêm sendo utilizados. A metionina e a colina são dois componentes de extrema importância para a β -oxidação mitocondrial hepática e para a síntese de VLDL, a qual é importante para a exportação hepática de ácidos graxos (ANSTEE & GOLDIN, 2006). A deficiência da metionina e da colina resulta no acúmulo de gordura no fígado, o que favorece o desenvolvimento da NAFLD. Camundongos alimentados com dieta deficiente em metionina e colina (MCD) durante quatro semanas apresentam esteatose (WELTMAN *et al.*, 1996). Com 10 semanas de dieta MCD a esteatose torna-se mais intensa, além de apresentar inflamação e fibrose pericelular

e perivenular (LECLERCQ *et al.*, 2000). Aspectos importantes são que camundongos alimentados com dieta MCD não apresentam resistência à insulina e exibem significativa perda de peso corpóreo quando comparados aos controles (RINELLA & GREEN, 2004).

Os modelos acima descritos para estudo da NAFLD vêm sendo largamente empregados, mas não simulam as condições observadas em indivíduos com essa doença. Mais recentemente, camundongos alimentados com dietas ricas em gordura (*High Fat Diets* – HFD) vêm sendo empregados com esse objetivo, devido à similaridade com a NAFLD no homem. Dessa forma, foi mostrado que camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HF líquida, composta por 37% de gordura (óleo de milho) durante nove semanas, apresentaram obesidade progressiva, resistência à insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia. Entretanto, somente metade dos animais avaliados desenvolveu NASH (DENG *et al.*, 2005). Uma desvantagem deste modelo é que os animais são alimentados à força e continuamente através de sondas intragástricas.

Um outro modelo é o de camundongos C57BL/6 alimentados *ad libitum* com dieta HF (60% de gordura representada por banha de porco) durante 10, 19, 34 e 50 semanas. Estes animais exibem obesidade e hiperinsulinemia e, quanto às alterações histológicas, todos os grupos exibiram esteatose. Entretanto, o desenvolvimento de NASH foi observado apenas após 35 semanas de dieta e a fibrose apenas após a quinquagésima semana (ITO *et al.*, 2007).

Recentemente, Charlton e colaboradores (2011) propuseram o modelo de camundongo *fast food diet*. Camundongos C57BL/6 foram alimentados durante 25 semanas com uma dieta composta por 40% de gordura. Além disso, a água oferecida continha xarope de milho. Os animais desenvolveram obesidade e resistência à insulina. Quanto à histologia, foi observada presença de esteatose, inflamação, balonização hepatocelular e fibrose perissinusoidal.

Em nosso grupo, foram utilizados camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta HF (composta por 58% de gordura, representada por óleos de soja e coco) para indução da diabetes, com o objetivo de avaliar a presença de alterações cardíacas nestes animais. Os animais apresentaram obesidade progressiva, intolerância a glicose e dislipidemia. Interessantemente, a avaliação histopatológica do fígado destes animais mostrou alterações características de NASH, como esteatose, inflamação, balonização e fibrose. Esta descoberta abre perspectiva para

a utilização deste novo modelo animal em estudos para investigação dos mecanismos envolvidos na patogênese da NAFLD.

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência da NAFLD tem aumentado progressivamente nos últimos anos, e este aumento está associado ao número crescente de indivíduos obesos. Desta forma, devido às mudanças de hábitos alimentares e ao sedentarismo, a NAFLD tem se tornado a doença crônica hepática mais frequente, principalmente, em países ocidentais. Essa é uma doença de caráter espectral que vai desde a esteatose até a esteato-hepatite, podendo progredir para formas mais graves como a cirrose, e, até mesmo, o carcinoma hepatocelular. Os mecanismos envolvidos na progressão da NAFLD são pouco conhecidos e têm sido amplamente investigados. Neste contexto, os modelos murinos da NAFLD têm servido como importantes ferramentas na elucidação destes mecanismos. Entretanto, a maioria dos modelos disponíveis consiste de camundongos que apresentam modificações genéticas ou que são submetidos a dietas alimentares deficientes que não reproduzem a maior parte das causas do desenvolvimento de NAFLD na maioria dos indivíduos acometidos. Recentemente, os modelos murinos de NAFLD baseados na alimentação com dieta de alto teor lipídico, têm reproduzido vários aspectos metabólicos e histológicos da NAFLD em humanos. Em nosso laboratório, utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dieta HF, observamos alterações metabólicas e histológicas características da NAFLD humana. A comparação sistemática destes achados com as alterações observadas em humanos torna-se necessária para a validação deste novo modelo murino. A hipótese deste trabalho é que alterações histológicas hepáticas observadas em indivíduos obesos se assemelham às alterações observadas em camundongos alimentados com dieta HF.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar, comparativamente, alterações histopatológicas em fígados de pacientes obesos e em fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar, comparativamente, a esteatose, a balonização hepatocelular, a inflamação, os corpúsculos de Mallory-Denk e a fibrose em fígados de pacientes obesos e em fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura

2. Avaliar, comparativamente, a ativação de células estelares hepáticas e a proliferação de células progenitoras hepáticas em fígados de pacientes obesos e em fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hipercalórica rica em gordura

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras hepáticas humanas

Fígados de pacientes obesos, submetidos à cirurgia bariátrica, foram utilizados para avaliar as alterações histológicas hepáticas e a expressão *in situ* de proteínas relacionadas à patogênese da NAFLD, em humanos. As amostras hepáticas utilizadas no presente estudo foram provenientes do projeto de mestrado da estudante Mariana Gouveia (GOUVEIA, 2006) e consistiu em fragmentos de fígado já incluídos em blocos de parafina. Amostras hepáticas de 20 pacientes foram utilizadas. As informações sobre os pacientes e sobre os procedimentos que foram realizados são descritos a seguir. As cirurgias bariátricas foram realizadas pelo Núcleo de Obesidade, liderado pelo Dr. Eriberto Alves, nos hospitais Santo Amaro e Português (Salvador – Bahia), no período entre 2004 e 2005. Os pacientes foram submetidos à cirurgia bariátrica laparoscópica, utilizando a técnica cirúrgica de “*bypass*” gástrico. Os fragmentos hepáticos foram obtidos a partir de biópsias em cunha, sendo este, um procedimento habitual durante a cirurgia bariátrica. Em seguida, os fragmentos foram fixados em formalina 10% e, posteriormente, incluídos em blocos de parafina. Os pacientes incluídos neste estudo exibiam IMC superior ou igual a 35 Kg/m². Nenhum dos pacientes incluídos no estudo apresentava histórico de consumo excessivo de álcool (maior que 20 gramas por dia), uso de drogas hepatotóxicas ou diagnósticos para hepatites B e C. Os dados clínicos e laboratoriais completos de cada paciente são apresentados em Anexo 1.

4.2. Amostras hepáticas murinas

Fígados de camundongos da linhagem C57BL/6, alimentados com dieta HF, foram utilizados para avaliar as alterações histológicas hepáticas e a expressão *in situ* de proteínas relacionadas à patogênese da NAFLD. Estes fígados foram obtidos de camundongos alimentados com dieta HF utilizados no projeto de mestrado de Alice Kiperstok (KIPERSTOK, 2010). O material utilizado no presente estudo consistiu em fragmentos de fígado já incluídos em blocos de parafina. Os procedimentos experimentais que foram realizados nos camundongos estão descritos a seguir. Camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 4 semanas de

vida, foram alimentados *ad libitum* durante oito (n=9) ou 10 meses (n=11) com dieta hipercalórica rica em gordura (dieta HF) para indução da obesidade. A dieta HF é composta por 58% de gordura (representada por gordura vegetal hidrogenada - óleos de soja e coco), 25,5% de carboidratos e 16,4% de proteínas (D12330 - Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). Foram utilizados como controles históricos, camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão do biotério (n=8) (9301 – Biobase, Águas Frias, SC, Brasil). Durante o experimento, mensurações de peso e glicemia, e testes de tolerância à glicose foram realizados. Após o período de indução da obesidade, os animais foram eutanasiados com quetamina (Ketamin-S; Cristália, Itapira-SP, Brasil) a 100mg/Kg e xilazina (Amesadan, Vetbrand, Jacareí-SP, Brasil) a 10mg/Kg. Os fígados dos animais foram removidos, fixados em formalina 10% e incluídos em blocos de parafina. Todos os animais utilizados foram provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) e mantidos neste mesmo local durante todo o estudo.

4.3. Avaliação das alterações histológicas hepáticas

Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 3µm e, em seguida, os tecidos hepáticos foram submetidos às colorações Hematoxilina & Eosina (H&E) e *PicrossíriusRed*, para fibras colágenas. Após as colorações serem concluídas, as lâminas foram observadas sob microscopia óptica (BX41, Olympus), em aumento de 20x e 40x, por um patologista em estudo cego. As alterações histológicas avaliadas foram: esteatoses macrovacuolar e microvacuolar, balonização hepatocelular, corpúsculos de Mallory-Denk, inflamações lobular e portal e fibroses perissinusoidal, portal e septal. Todas as alterações histológicas foram avaliadas quanto à sua presença e quanto à intensidade (ver detalhes no tópico Análises semi-quantitativas), exceto corpúsculos de Mallory-Denk, os quais foram avaliados somente em relação à presença. A localização das alterações em relação aos ácinos hepáticos também foi determinada (para esteatoses, balonização e fibrose perissinusoidal). As inflamações, lobular e portal, foram classificadas como mistas ou mononucleares, de acordo com o fenótipo celular dos infiltrados.

4.4. Imunoistoquímica

Foram realizadas imunomarcações utilizando a técnica da imunoistoquímica indireta. As proteínas avaliadas foram: alfa actina de músculo liso (α AML) e desmina, para avaliar a presença de células estrelares hepáticas ativadas, e citoqueratina 7 (CK7) e citoqueratina 19 (CK19), para avaliar a presença de células progenitoras hepáticas. Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela 1. As imunoistoquímicas realizadas, em amostras humanas e em amostras murinas, estão descritas em detalhes a seguir.

4.4.1. Material humano

Os fragmentos de fígado, preservados em blocos de parafina, foram seccionados em cortes de 3 μ m e transferidos para lâminas tratadas em solução de Poly-L-Lisine (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os cortes foram desparafinizados com duas lavagens em xilol P. A. (10 minutos cada lavagem), três lavagens em álcool absoluto (duas lavagens durante cinco minutos e uma lavagem instantânea), seis lavagens em água corrente (instantâneas) e uma lavagem em água destilada durante 30 segundos. Em seguida, foi realizada exposição antigênica do tecido em tampão citrato de sódio a 96°C durante 30 minutos. Após os cortes atingirem a temperatura ambiente, foram realizadas seis lavagens em água corrente e uma lavagem em água destilada. Posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol P. A. durante 15 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram lavados seis vezes em água corrente, uma vez em água destilada e uma vez em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1x com Tween 20 a 2% (PBST 2%). Para o bloqueio de ligações inespecíficas foi utilizada a solução Protein Block (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA) durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo primário diluído em diluente de anticorpos EnVision Flex (Dako, Carpinteria, CA, USA) foi adicionado e incubado *overnight* a 4°C (ver diluições de cada anticorpo na Tabela1). PBS 1x foi utilizado como controle negativo da reação. Os cortes foram lavados em PBST 2% e, posteriormente, foram incubados com o anticorpo secundário REVEAL Polyvalent HRP (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA) em duas etapas, primeiro com o complemento (anticorpo secundário anti-camundongo feito em coelho), durante 10

minutos, e depois com o conjugado HRP (anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra conjugado a HRP) durante 15 minutos, ambos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita lavagem em PBST 2%, revelação com solução comercial do cromógeno 3' diamino benzidina (DAB - Dako, Carpinteria, CA, USA) durante dois minutos, duas lavagens em água corrente, contra-coloração com hematoxilina Harris e montagem das lâminas com entellan.

4.4.2. Material murino

Os fígados, preservados em blocos de parafina, foram seccionados em cortes de 3µm, os quais foram transferidos para lâminas tratadas em solução de Poly-L-Lisine (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os cortes foram desparafinizados com três lavagens em xilol P. A. (10 minutos cada lavagem), uma lavagem em acetona P. A. (cinco minutos), duas lavagens em álcool absoluto (cinco minutos cada lavagem) e em seguida, foram hidratados em álcool 70%, 50% e 30%, respectivamente (um minuto cada lavagem). Os cortes foram lavados três vezes em água corrente, três vezes em água destilada, e colocados em PBS 1x. Posteriormente, foi realizada a exposição antigênica do tecido com tampão citrato de sódio 10mM a 96°C durante 30 minutos. Os cortes esfriaram durante 30 minutos no tampão citrato de sódio e, em seguida, foram lavados em PBS 1x com Tween 20 a 0,1% (PBST 0,1%). Foram realizados bloqueios de avidina e biotina endógenas (Kit de bloqueio avidina/biotina – Dako, Carpinteria, CA, USA) durante 10 minutos, cada bloqueio. Após o bloqueio da avidina e biotina endógenas, foi realizada lavagem dos cortes em PBST 0,1% e bloqueio de ligações inespecíficas com 10% de soro de cabra normal (Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) em solução PBST/BSA (BSA 4mg/mL em PBST 0,1%) durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo primário diluído em solução PBST/BSA (ver diluições de cada anticorpo na Tabela 1) foi adicionado e incubado *overnight* a 4°C. Para o controle negativo da reação foi utilizada imunoglobulina G (IgG) de coelho purificada (I-8140, Sigma, St. Louis, MO, USA) em concentração equivalente a que foi utilizada no anticorpo primário. Após a incubação com o anticorpo primário, foram feitas duas lavagens em PBST 0,1% e o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho biotilado feito em cabra), diluído em solução PBST/BSA com 5% de soro de cabra normal (Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e

5% de soro de camundongo normal (Abcam, Cambridge, MA, USA), foi adicionado durante 1 hora, em temperatura ambiente. Lavagens em PBST 0,1% foram realizadas e, posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com azida sódica 0,01% e peróxido de hidrogênio 1% em PBS 1x, durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram lavados em água destilada, em PBST 0,1%, e foi adicionada a estreptoavidina peroxidase (Pierce, Rockford, IL, USA) a 2 μ g/mL em PBS 1x, durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram realizadas lavagens em PBST 0,1% e foi feita a revelação com o cromógeno DAB (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 600 μ g/mL e peróxido de hidrogênio 0,03% em PBS 1x, durante 40 segundos. A revelação foi interrompida com mergulho das lâminas em água destilada e, em seguida, foi feita a contra-coloração com hematoxilina Harris e a montagem das lâminas com entellan.

Tabela 1: Anticorpos utilizados em imunistoquímicas de tecido murino e tecido humano

Anticorpo	Fabricante	Clonalidade	Reatividade	Origem	Diluição
Anti- α AML	Abcam (ab32575)	Monoclonal	Camundongo	Coelho	1:250
Anti-Desmina	Abcam (ab32362)	Monoclonal	Camundongo	Coelho	1:500
Anti-CK 7	Abcam (ab90083)	Policlonal	Camundongo	Coelho	1:200
Anti-CK 19	Abcam (ab15463)	Policlonal	Camundongo	Coelho	1:200
Anti- α AML	Dako (M0851)	Monoclonal	Humano	Camundongo	1:500
Anti-Desmina	Dako	Monoclonal	Humano	Camundongo	1:250
Anti-CK 7	Dako (M7018)	Monoclonal	Humano	Camundongo	1:150
Anti-CK 19	Dako (M0888)	Monoclonal	Humano	Camundongo	1:20

4.5. Análises semi-quantitativas das alterações hepáticas e das imunomarcações, e estatísticas

Para avaliar a intensidade das alterações hepáticas observadas foram realizadas análises semi-quantitativas. As esteatoses (macrovacuolar e microvacuolar) e a balonização foram classificadas de acordo com o percentual aproximado da área comprometida em um corte histológico, sendo discreta (menor que 33%), moderada (entre 33% e 66%) ou intensa (maior que 66%). As inflamações, lobular e portal, foram classificadas em discreta, moderada ou intensa, de acordo com o número de focos inflamatórios. As fibroses foram identificadas de acordo com suas intensidades em discreta, moderada ou intensa.

Em relação às imunomarcações, as lâminas foram observadas sob microscopia óptica (BX41, Olympus), em aumento de 20x e 40x, por um patologista em estudo cego. Foram avaliadas a presença e a intensidade da marcação para cada proteína avaliada. Deve-se destacar que, neste caso, a intensidade da marcação representou quantidade de células positivas. Desse modo, a marcação foi

semi-quantitativamente classificada em discreta, moderada ou intensa. Os grupos murinos foram comparados entre si, em relação à presença e à intensidade das alterações, utilizando análises de contingência. O teste exato de Fisher foi utilizado. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o GraphPad Prism versão 5. Não foram realizadas análises estatísticas entre os grupos murino e o grupo de pacientes obesos e, neste caso, foram feitas análises qualitativas.

4.6. Considerações éticas

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA 002/07) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 253/2012) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

5. RESULTADOS

5.1. Modelo murino

Fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses, foram avaliados quanto à presença e à intensidade de alterações histológicas hepáticas relacionadas à NAFLD, quais sejam: esteatoses macrovacuolar e microvacuolar, balonização hepatocelular, inflamações lobular e portal, fibroses perissinusoidal, portal e septal e corpúsculos de Mallory-Denk. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.1.1. Esteatose macrovacuolar

Fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses, apresentaram esteatose macrovacuolar, o que não foi observado em fígados de camundongos do grupo controle (Fig. 1A). A esteatose macrovacuolar esteve presente em 100% dos camundongos alimentados com a dieta HF, por oito ou 10 meses, e se distribuiu entre as zonas 1, 2 e 3 dos ácinos hepáticos (Tabela 2). Quanto à intensidade, fígados de camundongos alimentados com a dieta HF durante oito meses exibiram esteatose macrovacuolar discreta (44,4%) e moderada (55,6%). A manutenção da dieta HF por 10 meses também resultou em esteatose macrovacuolar discreta (18,2%) e moderada (81,8%) (Tabela 3).

5.1.2. Esteatose microvacuolar

A esteatose microvacuolar foi observada em fígados de camundongos alimentados com a dieta HF e não foi observada em nenhum dos camundongos do grupo controle (Fig. 1B). Entretanto, a esteatose microvacuolar foi mais presente no grupo de 10 meses de dieta HF (100% dos casos) do que no grupo de oito meses (55,6% dos casos) ($p=0,026$) (Tabela 2). Quando presente, a esteatose microvacuolar se distribuiu, principalmente, nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos. Em relação à intensidade, a esteatose microvacuolar foi moderada (40%) a intensa (60%) no grupo de oito meses de dieta HF. No grupo de 10 meses, foi observada esteatose discreta (9,1%), moderada (36,4%) e intensa (54,5%) (Tabela 3).

5.1.3. Balonização hepatocelular

Fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses, apresentaram balonização hepatocelular (Fig. 1C). Este achado foi observado em 100% dos casos. Camundongos do grupo controle não apresentaram esta alteração (Tabela 2). A balonização hepatocelular estava distribuída, na maioria dos casos, na zona 3 dos ácinos hepáticos. No grupo de oito meses de dieta HF, a balonização foi discreta (11,1%), moderada (33,3%) ou intensa (55,6%), enquanto que no grupo de 10 meses de dieta HF, a maioria dos casos (81,8%) apresentou balonização moderada (Tabela 3).

5.1.4. Corpúsculos de Mallory-Denk

A presença de corpúsculos de Mallory-Denk foi observada em todos os fígados de camundongos alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses (Fig. 1D). Fígados de camundongos do grupo controle não apresentaram corpúsculos de Mallory-Denk (Tabela 2).

5.1.5. Inflamação lobular

A inflamação lobular esteve presente em fígados de 100% dos casos de camundongos alimentados com a dieta HF, tanto de oito meses, quanto de 10 meses (Fig. 2A). Esta inflamação apresentou fenótipo misto e tinha distribuição não zonal em relação aos ácinos hepáticos. Fígados de camundongos do grupo controle não exibiram inflamação lobular (Tabela 2). Quanto à intensidade, a inflamação foi discreta em 100% dos casos de camundongos alimentados durante oito meses com a dieta HF. Por outro lado, no grupo de 10 meses, a inflamação lobular se intensificou, sendo discreta em 27,3% dos casos, moderada em 54,5% dos casos e intensa em 18, 2% dos casos ($p=0,0014$) (Tabela 3).

5.1.6. Inflamação portal

Inflamação portal foi observada somente nos fígados de camundongos alimentados com a dieta HF durante 10 meses, em 100% dos casos (Fig. 2B).

Fígados de camundongos alimentados com a dieta HF durante oito meses e fígados de camundongos do grupo controle não exibiram esta alteração hepática (Tabela 2). Quando presente, a inflamação portal exibiu fenótipo misto. A intensidade da inflamação portal foi, na maioria dos casos, discreta (63,6%) (Tabela 3).

5.1.7. Fibrose perissinusoidal

Fígados de camundongos alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses, apresentaram fibrose perissinusoidal, o que não foi observado em fígados de camundongos do grupo controle (Fig. 3A e B). A fibrose perissinusoidal foi observada em 100% dos casos de camundongos alimentados com a dieta HF (oito ou 10 meses) e se distribuiu na zona 3 dos ácinos hepáticos (Tabela 2). Quanto à intensidade, a fibrose perissinusoidal foi discreta em 100% dos camundongos do grupo de oito meses de dieta HF. No grupo de 10 meses de dieta HF, a fibrose se intensificou, sendo discreta em 45,5% dos casos e moderada em 54,5% dos casos ($p=0,014$) (Tabela 3).

5.1.8. Fibrose portal

A fibrose portal não foi observada em nenhum dos fígados de camundongos alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses (Fig. 3C). Da mesma forma, fígados de camundongos do grupo controle também não exibiram fibrose portal (Tabela 2).

5.1.9. Fibrose septal

A fibrose septal foi observada somente em fígados de camundongos do grupo de 10 meses de dieta HF, em 27,3% dos casos (Fig. 3C). Fígados de camundongos do grupo de oito meses de dieta HF e de camundongos do grupo controle não exibiram fibrose septal (Tabela 2). Quando presente, a fibrose observada foi discreta (100% dos casos) (Tabela 3).

Tabela 2: Alterações hepáticas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle

Alteração hepática	Grupo Controle (n=8)	Grupo HFD – 8 meses (n=9)	Grupo HFD – 10 meses (n=11)
Esteatose macrovacuolar n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Esteatose microvacuolar n (%)			
Presente	0 (0)	5 (55,6)	11 (100)
Ausente	8 (100)	4 (44,4)	0 (0)
Balonização hepatocelular n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Mallory-Denk n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Inflamação lobular n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Inflamação portal n (%)			
Presente	0 (0)	0 (0)	11 (100)
Ausente	8 (100)	9 (100)	0 (0)
Fibrose perissinusoidal n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Fibrose portal n (%)			
Presente	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ausente	8 (100)	9 (100)	11 (100)
Fibrose septal n (%)			
Presente	0 (0)	0 (0)	3 (27,3)
Ausente	8 (100)	9 (100)	8 (72,7)

Tabela 3: Intensidade das alterações hepáticas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle

Alteração hepática	Grupo HFD – 8 meses	Grupo HFD – 10 meses
Esteatose macrovacuolar n (%)		
Discreta	4/9 (44,4)	2/11 (18,2)
Moderada	5/9 (55,6)	9/11 (81,8)
Intensa	0/9 (0)	0/11 (0)
Esteatose microvacuolar n (%)		
Discreta	0/5 (0)	1/11 (9,1)
Moderada	2/5 (40)	4/11 (36,4)
Intensa	3/5 (60)	6/11 (54,5)
Balonização hepatocelular n (%)		
Discreta	1/9 (11,1)	0/11 (0)
Moderada	3/9 (33,3)	9/11 (81,8)
Intensa	5/9 (55,6)	2/11 (18,2)
Inflamação lobular n (%)		
Discreta	9/9 (100)	3/11 (27,3)
Moderada	0/9 (0)	6/11 (54,5)
Intensa	0/9 (0)	2/11 (18,2)
Inflamação portal n (%)		
Discreta	-	7/11 (63,6)
Moderada	-	4/11 (36,4)
Intensa	-	0/11 (0)
Fibrose perissinusoidal n (%)		
Discreta	9/9 (100)	5/11 (45,5)
Moderada	0/9 (0)	6/11 (54,5)
Intensa	0/9 (0)	0/11 (0)
Fibrose septal n (%)		
Discreta	-	3/3 (100)
Moderada	-	0/3 (0)
Intensa	-	0/3 (0)

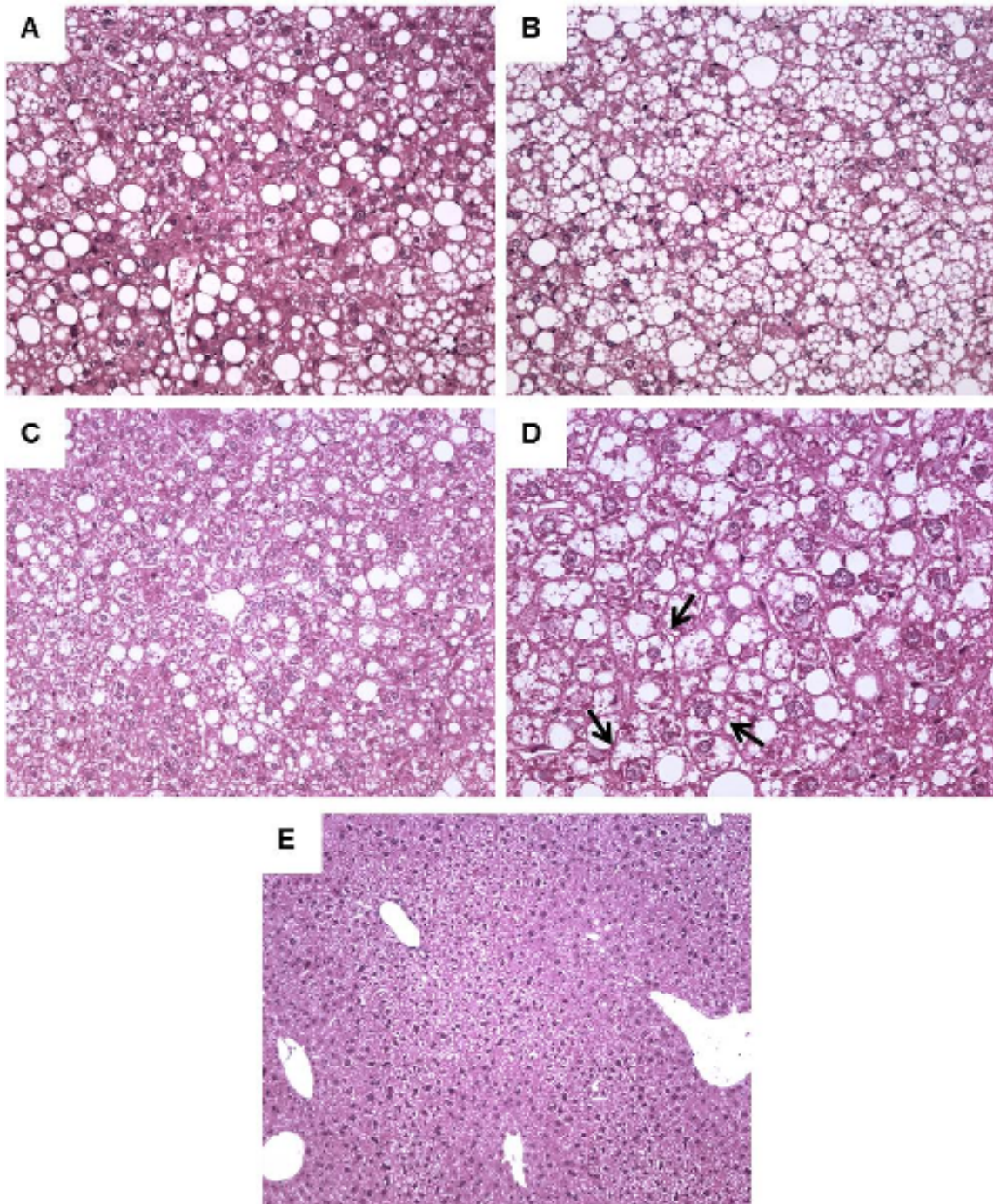


Figura 1: Alterações celulares em fígados de camundongos alimentados com dieta HF; Fígados de camundongos alimentados com dieta HF foram avaliados quanto à presença de alterações celulares características da NAFLD. (A-D) Imagens representativas de fígados de camundongos alimentados com dieta HF. (A) Esteatose macrovacuolar (H&E, 200x); (B) Esteatose microvacuolar (H&E, 200x); (C) Balonização hepatocelular (H&E, 200x); (D) Hepatócitos contendo corpúsculos de Mallory-Denk são visualizados (setas) (H&E, 400x); (E) Fígado de camundongo alimentado com dieta padrão (H&E, 100x).

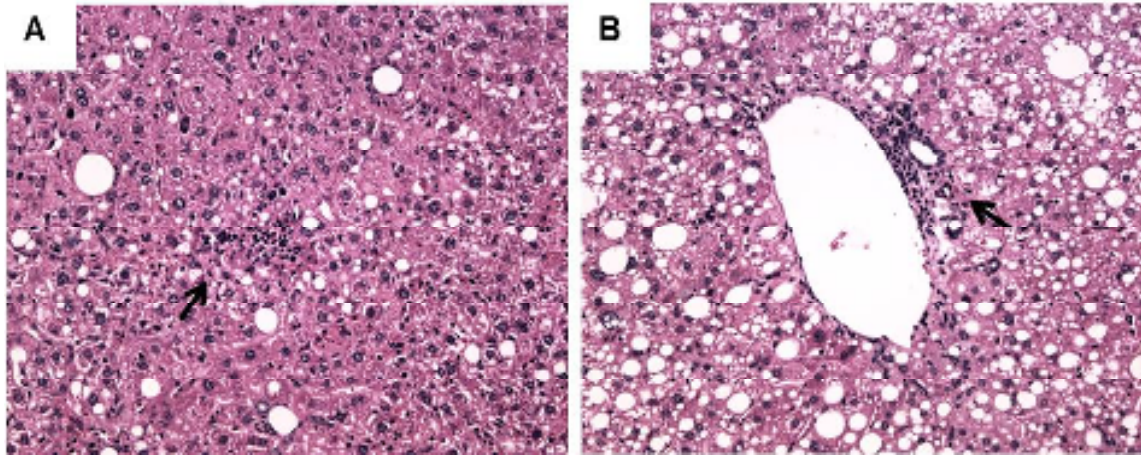


Figura 2: Inflamação lobular e inflamação portal em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Fígados de camundongos alimentados com dieta HF foram avaliados quanto à presença das inflamações lobular e portal. (A) Inflamação lobular. Detalhe do foco inflamatório (seta) (H&E, 200x); (B) Inflamação portal. Detalhe do foco inflamatório (seta) (H&E, 200x).

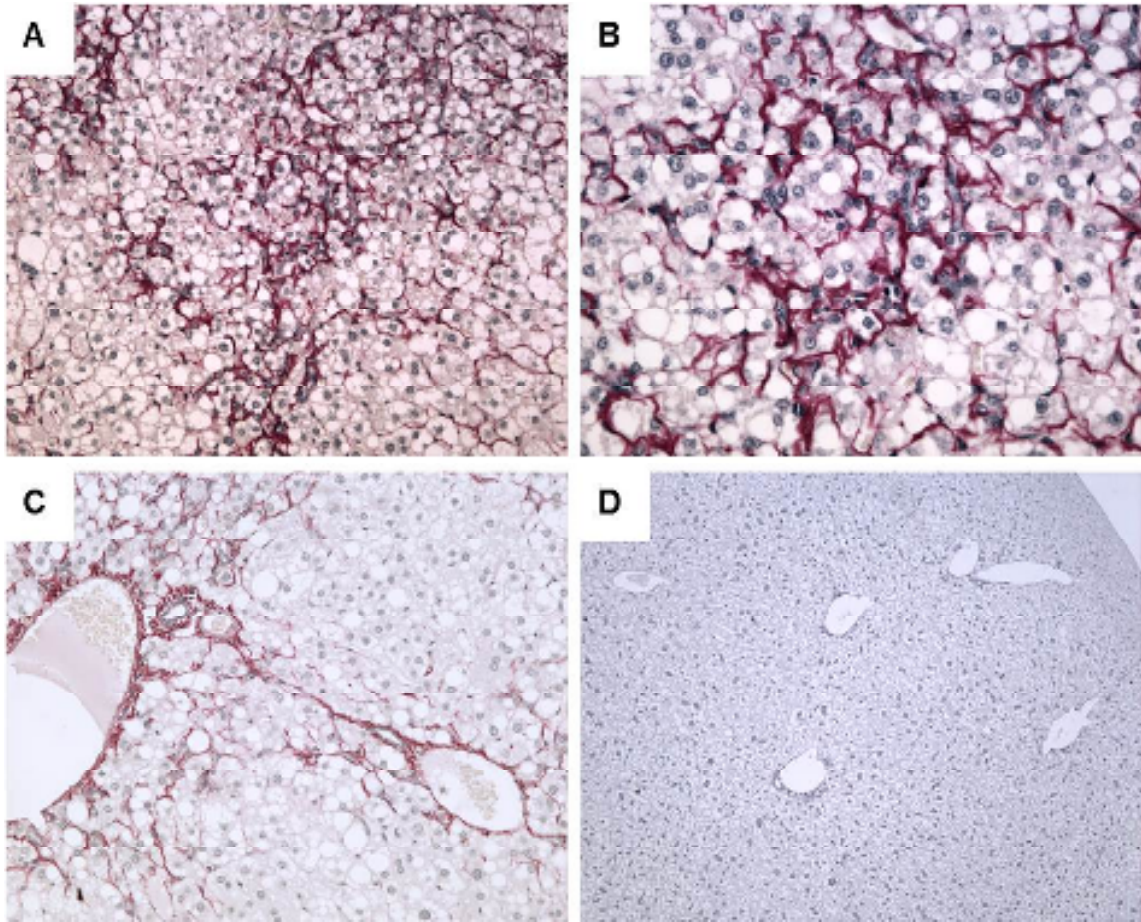


Figura 3: Fibrose em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Fígados de camundongos alimentados com dieta HF foram avaliados quanto à presença das fibroses perissinusoidal, portal e septal. (A-C) Imagens representativas de fígados de camundongos alimentados com dieta HF. (A) Fibrose perissinusoidal (*Picrossirius Red*, 200x); Em B, fibrose perissinusoidal em maior aumento (*Picrossirius Red*, 400x); (C) Fibrose septal discreta e ausência de fibrose portal (*Picrossirius Red*, 200x); (D) Fígado de camundongo alimentado com dieta padrão (*Picrossirius Red*, 100x).

5.1.10. Presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em modelo murino de NAFLD

Para avaliar a presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em fígados de camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta HF, a expressão *in situ* da alfa-actina de músculo liso e desmina, e da citoqueratina 7 e citoqueratina 19 foi avaliada.

Células expressando alfa-actina de músculo liso foram observadas em todos os fígados de camundongos alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses. Células positivas para alfa-actina também foram observadas em 87,5% dos casos de camundongos do grupo controle (Tabela 4). Estas células apresentavam-se fusiformes e se distribuíam pelo parênquima hepático (Fig. 4). Quanto à intensidade, no grupo controle, a marcação foi discreta em 85,7% dos casos e moderada em 14,3% dos casos. No grupo de oito meses, foram observadas marcações de intensidade discreta (44,4% dos casos) e moderada (55,6% dos casos). O grupo de 10 meses apresentou 36,4% dos casos com marcação moderada e 63,6% dos casos com marcação intensa. O grupo de 10 meses exibiu marcação para alfa-actina mais acentuada do que o grupo de oito meses ($p=0,026$) e do que o grupo controle ($p=0,0004$) (Tabela 5).

Células expressando desmina foram observadas somente em fígados de camundongos alimentados com a dieta HF durante 10 meses, em 72,7% dos casos. Fígados de camundongos do grupo controle e do grupo de oito meses de dieta HF não exibiram células positivas para desmina (Tabela 4). Estas células eram fusiformes e exibiam citoplasma delgado (Fig. 5). Quando presente, a intensidade da marcação foi discreta em 75% dos casos e moderada em 25% dos casos (Tabela 5).

Células positivas para citoqueratina 7 foram observadas no parênquima hepático de camundongos alimentados com a dieta HF. Estas células positivas apresentavam forma alongada e se distribuíam no parênquima hepático, algumas vezes próximas aos ductos biliares (os quais, constitutivamente, exibem células positivas para citoqueratina 7) (Fig. 6). No grupo de oito meses, 66,7% dos casos exibiram células positivas para citoqueratina 7, entretanto, no grupo de 10 meses, a frequência de casos que apresentavam células positivas foi maior (100% dos casos). Fígados de camundongos do grupo controle também exibiram células positivas para citoqueratina 7, em 50% dos casos (Tabela 4). A frequência de casos que

apresentaram marcação para citoqueratina 7 foi maior no grupo de 10 meses quando comparados com o grupo controle ($p=0,018$). Em relação à intensidade, a marcação foi discreta em 100% dos casos do grupo controle. No grupo de oito meses, a marcação foi discreta (83,3% dos casos) e moderada (16,7% dos casos), enquanto que no grupo de 10 meses a marcação foi discreta em 36,4% dos casos, moderada em 27,3% dos casos e intensa em 36,4% dos casos (Tabela 5).

A presença de células positivas para citoqueratina 19 foi observada no parênquima hepático de todos os camundongos alimentados com a dieta HF, sejam de oito ou 10 meses. Os fígados dos camundongos do grupo controle não apresentaram marcação para citoqueratina 19 (Tabela 4). Semelhante às células positivas para citoqueratina 7, as células positivas para citoqueratina 19 exibiam formas alongadas e se distribuíam ao longo do parênquima hepático, algumas vezes próximas ao ductos biliares (Fig. 7). No grupo de oito meses de dieta HF, a marcação foi discreta na maioria dos casos (77,8%). No grupo de 10 meses de dieta HF, observaram-se marcações discreta (45,4% dos casos), moderada (36,4% dos casos) e intensa (18,2% dos casos) (Tabela 5).

Tabela 4: Imunomarcações em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle

Imunomarcação	Grupo Controle (n=8)	Grupo HFD – 8 meses (n=9)	Grupo HFD – 10 meses (n=11)
Citoqueratina 7 n (%)			
Presente	4 (50)	6 (66,7)	11 (100)
Ausente	4 (50)	3 (33,3)	0 (0)
Citoqueratina 19 n (%)			
Presente	0 (0)	9 (100)	11 (100)
Ausente	8 (100)	0 (0)	0 (0)
Alfa actina de músculo liso n (%)			
Presente	7 (87,5)	9 (100)	11 (100)
Ausente	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)
Desmina n (%)			
Presente	0 (0)	0 (0)	8 (72,7)
Ausente	8 (100)	9 (100)	3 (27,3)

Tabela 5: Intensidade das imunomarcações em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle

Imunomarcação	Grupo Controle	Grupo HFD – 8 meses	Grupo HFD – 10 meses
Citoqueratina 7 n (%)			
Discreta	4/4 (100)	5/6 (83,3)	4/11 (36,4)
Moderada	0/4 (0)	1/6 (16,7)	3/11 (27,3)
Intensa	0/4 (0)	0/6 (0)	4/11 (36,4)
Citoqueratina 19 n (%)			
Discreta	-	7/9 (77,8)	5/11 (45,4)
Moderada	-	1/9 (11,1)	4/11 (36,4)
Intensa	-	1/9 (11,1)	2/11 (18,2)
Alfa actina de músculo liso n (%)			
Discreta	6/7 (85,7)	4/9 (44,4)	0/11 (0)
Moderada	1/7 (14,3)	5/9 (55,6)	4/11 (36,4)
Intensa	0/7 (0)	0/9 (0)	7/11 (63,6)
Desmina n (%)			
Discreta	-	-	6/8 (75)
Moderada	-	-	2/8 (25)
Intensa	-	-	0/8 (0)

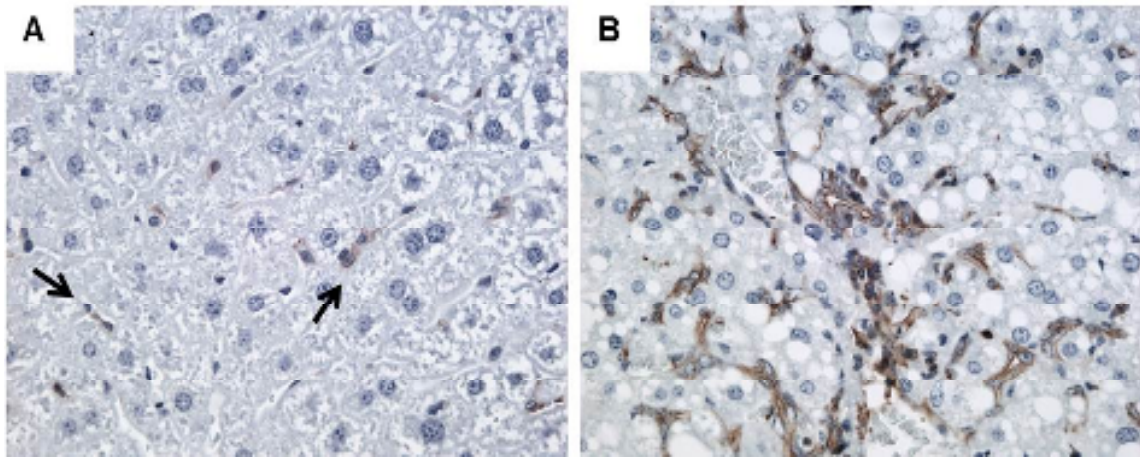


Figura 4: Expressão de alfa-actina de músculo liso em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle, utilizando a técnica da imunistoquímica indireta. (A) Fígado de camundongo do grupo controle. Células positivas para alfa-actina de músculo liso (setas) (400x); (B) Fígado de camundongo alimentado com dieta HF apresentando várias células positivas para alfa-actina de músculo liso (400x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 2.

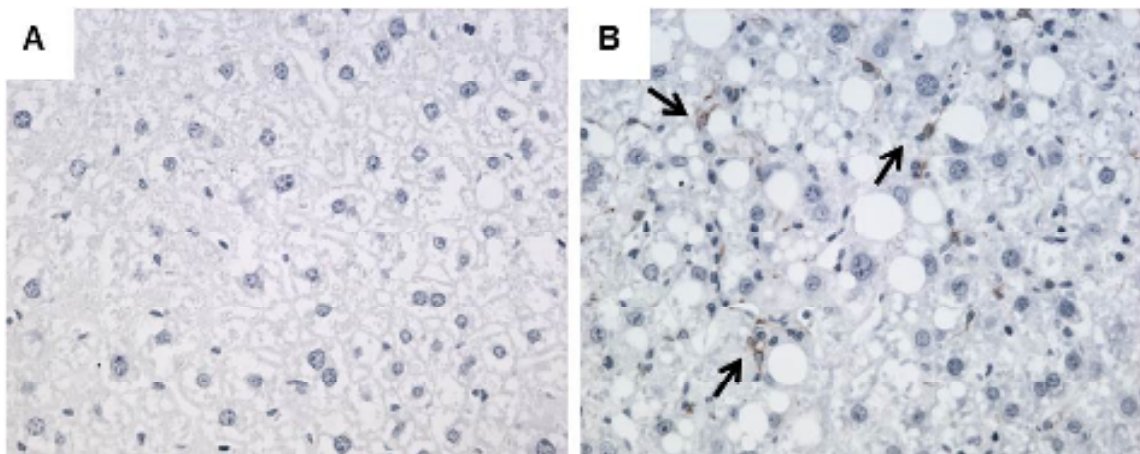


Figura 5: Expressão de desmina em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle, utilizando a técnica da imunistoquímica indireta. (A) Fígado de camundongo do grupo controle sem células positivas para desmina (400x); (B) Fígado de camundongo alimentado com dieta HF apresentando algumas células positivas para desmina (setas) (400x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 3.

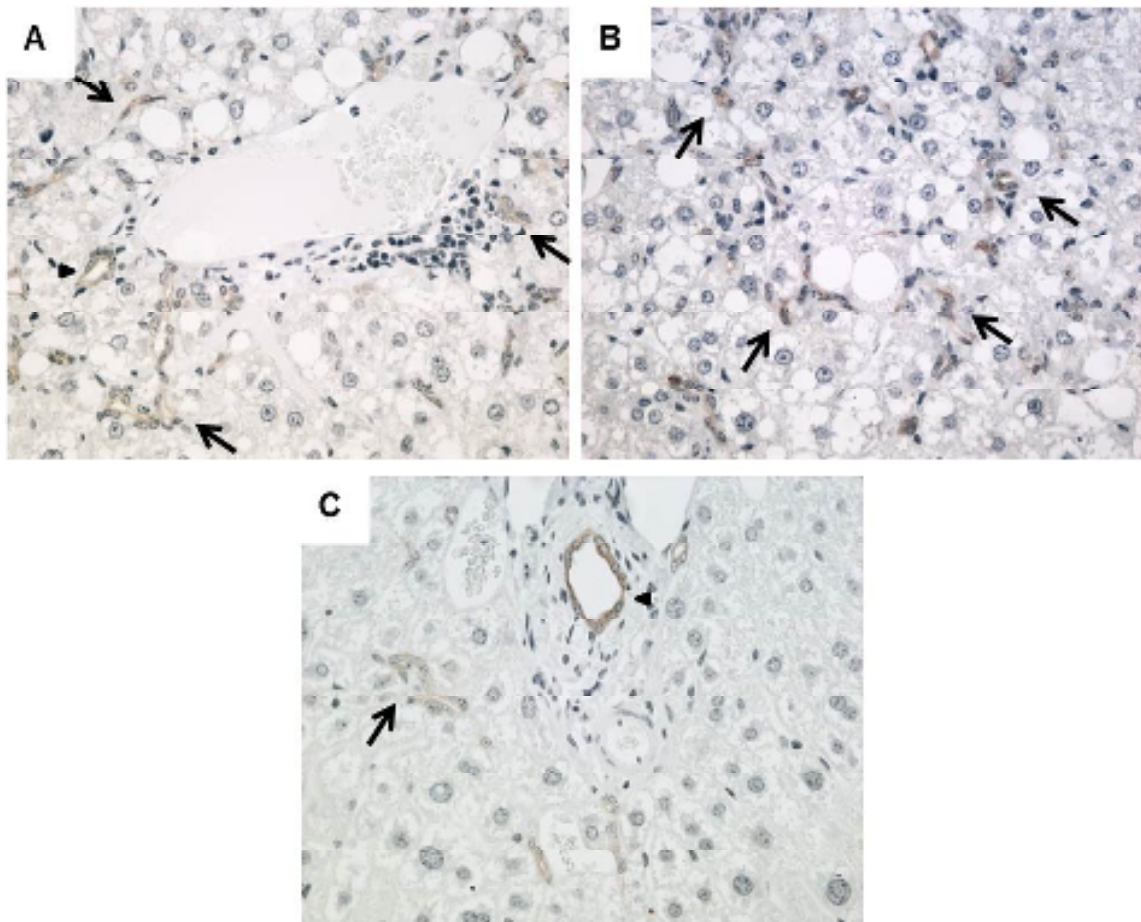


Figura 6: Expressão de citoqueratina 7 em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle, utilizando a técnica da imunohistoquímica indireta. (A) Área portal de fígado de camundongo alimentado com dieta HF apresentando células positivas para citoqueratina 7 (setas). Presença de células positivas para citoqueratina 7 no ducto biliar (cabeça de seta) (400x); (B) Parênquima hepático de camundongo alimentado com dieta HF apresentando células positivas para citoqueratina 7 (setas) (400x); (C) Fígado de camundongo do grupo controle com poucas células positivas para citoqueratina 7 (setas). Presença de células positivas para citoqueratina 7 no ducto biliar (cabeça de seta) (400x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 4.

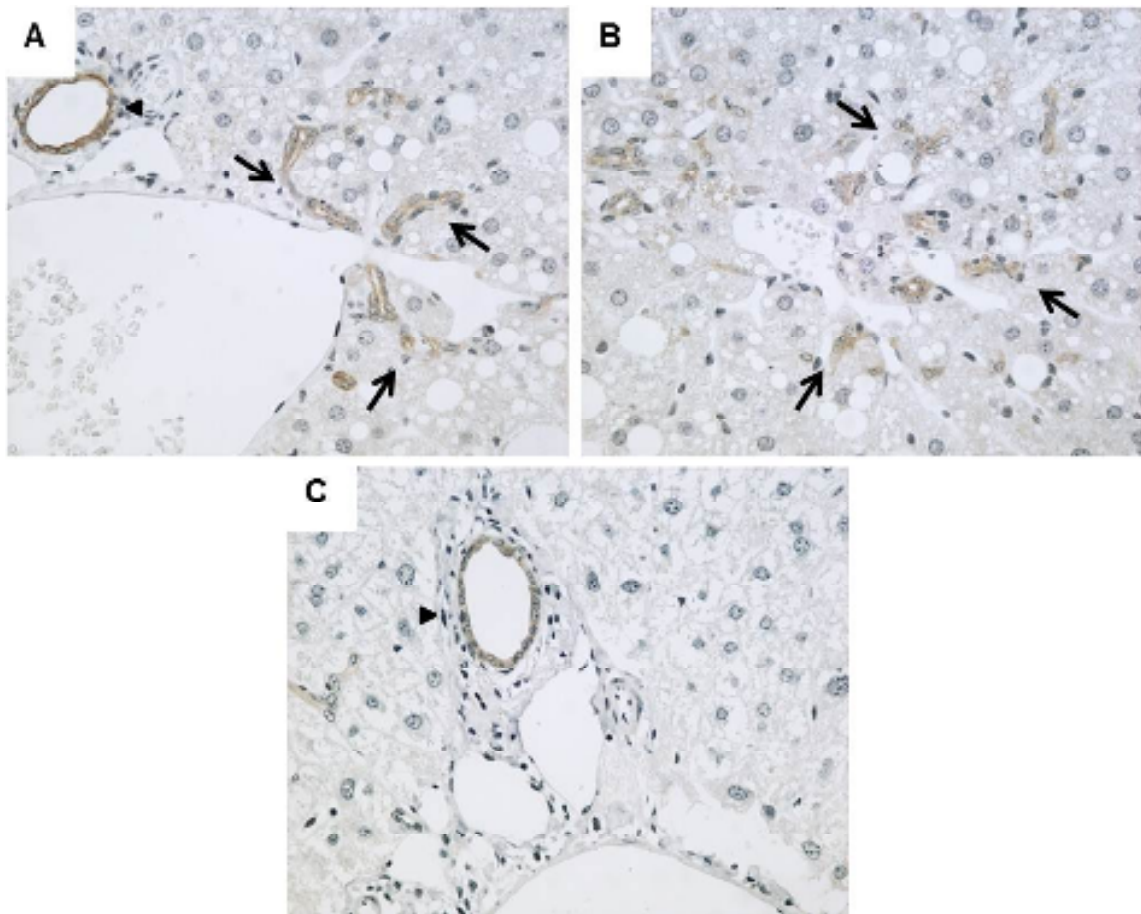


Figura 7: Expressão de citoqueratina 19 em fígados de camundongos alimentados com dieta HF. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de camundongos alimentados com dieta HF e em fígados de camundongos do grupo controle, utilizando a técnica da imunistoquímica indireta. (A) Área portal de fígado de camundongo alimentado com dieta HF apresentando células positivas para citoqueratina 19 (setas). Presença de células positivas para citoqueratina 19 no ducto biliar (cabeça de seta) (400x); (B) Parênquima hepático de camundongo alimentado com dieta HF apresentando células positivas para citoqueratina 19 (setas) (400x); (C) Fígado de camundongo do grupo controle apresentando células positivas para citoqueratina 19 somente no ducto biliar (cabeça de seta) (400x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 5.

5.2. Pacientes obesos

Fígados de pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica foram avaliados quanto à presença e à intensidade de alterações histológicas hepáticas relacionadas à NAFLD, quais sejam: esteatose macrovacuolar e microvacuolar, balonização hepatocelular, inflamações lobular e portal, fibroses perissinusoidal, portal e septal e corpúsculos de Mallory.

5.2.1. Esteatose macrovacuolar

Os fígados de todos os pacientes obesos avaliados apresentaram esteatose macrovacuolar (Tabela 6). Esta alteração foi observada, principalmente, nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos (Fig. 8A). Quanto à intensidade, a esteatose macrovacuolar foi discreta em 40% dos casos, moderada em 30% dos casos e intensa em 30% dos casos (Tabela 7).

5.2.2. Esteatose microvacuolar

Alguns pacientes obesos (35% dos casos) apresentaram esteatose microvacuolar (Fig. 8B), entretanto, a maioria dos pacientes (65% dos casos) não apresentaram esta alteração hepática (Tabela 6). Quando presente, a esteatose microvacuolar estava distribuída, principalmente, nas zonas 3 dos ácinos hepáticos ou foi azonal. A maioria dos casos apresentou esteatose microvacuolar discreta (85,7%), mas também pôde-se observar esteatose moderada em 14,3% dos casos (Tabela 7).

5.2.3. Balonização hepatocelular

Balonização hepatocelular foi observada no fígado de todos os pacientes obesos avaliados (Tabela 6). A balonização se distribuiu, principalmente, nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos, ou foi pan acinar (Fig. 8C). Quanto à intensidade, a balonização foi discreta em 25% dos casos, moderada em 35% dos casos e intensa em 40% dos casos (Tabela 7).

5.2.4. Corpúsculos de Mallory-Denk

A presença dos corpúsculos de Mallory-Denk foi observada no fígado de 30% dos pacientes obesos avaliados (Tabela 6 e Fig. 8D).

5.2.5. Inflamação lobular

Assim como a balonização hepatocelular, a inflamação lobular foi observada no fígado de todos os pacientes obesos avaliados (Tabela 6). A inflamação lobular exibiu fenótipo misto (Fig. 9A). Em relação à intensidade, 35% dos casos exibiram inflamação lobular discreta, 50% dos casos exibiram inflamação moderada e 15% dos casos, inflamação intensa (Tabela 7).

5.2.6. Inflamação portal

A inflamação portal esteve presente em 95% dos casos dos pacientes obesos avaliados e exibiu fenótipo mononuclear (Tabela 6 e Fig. 9B). A inflamação portal observada foi, predominantemente, de intensidade discreta (73,7% dos casos), apesar de se observar também inflamação portal moderada (15,8% dos casos) e intensa (10,5% dos casos) (Tabela 7).

5.2.7. Fibrose perissinusoidal

O fígado de todos os pacientes obesos avaliados apresentou fibrose perissinusoidal (Tabela 6). Esta alteração se distribuiu, principalmente, nas zonas 2 e 3 dos ácinos hepáticos (Fig. 10A e B). Sessenta e cinco por cento dos casos avaliados exibiram fibrose perissinusoidal de intensidade discreta. Casos com intensidade moderada e intensa também foram observados, 30% e 5%, respectivamente (Tabela 7).

5.2.8. Fibrose portal

A fibrose portal foi observada no fígado de 45% dos pacientes obesos avaliados (Tabela 6 e Fig. 10C). Quanto à intensidade, a fibrose portal foi discreta em 78% dos casos que exibiam esta alteração. Onze por cento dos casos foram de intensidade moderada e os outros 11% dos casos, de intensidade intensa (Tabela 7).

5.2.9. Fibrose septal

A maioria dos pacientes obesos (90% dos casos) não exibiu fibrose septal na análise hepática (Tabela 6). Nos fígados de pacientes que apresentaram fibrose septal, esta alteração foi de intensidade discreta (50%) e intensa (50%) (Tabela 7 e Fig. 10D).

Tabela 6: Alterações hepáticas em fígados de pacientes obesos

Alteração hepática	Pacientes obesos n=20
Esteatose macrovacuolar n (%)	
Presente	20 (100)
Ausente	0 (0)
Esteatose microvacuolar n (%)	
Presente	7 (35)
Ausente	13 (65)
Balonização hepatocelular n (%)	
Presente	20 (100)
Ausente	0 (0)
Mallory-Denk n (%)	
Presente	6 (30)
Ausente	14 (70)
Inflamação lobular n (%)	
Presente	20 (100)
Ausente	0 (0)
Inflamação portal n (%)	
Presente	19 (95)
Ausente	1 (5)
Fibrose perissinusoidal n (%)	
Presente	20 (100)
Ausente	0 (0)
Fibrose portal n (%)	
Presente	9 (45)
Ausente	11 (55)
Fibrose septal n (%)	
Presente	2 (10)
Ausente	18 (90)

Tabela 7: Intensidade das alterações hepáticas em fígados de pacientes obesos

Alteração hepática	Pacientes obesos
Esteatose macrovacuolar n (%)	
Discreta	8/20 (40)
Moderada	6/20 (30)
Intensa	6/20 (30)
Esteatose microvacuolar n (%)	
Discreta	6/7 (85,7)
Moderada	1/7 (14,3)
Intensa	0/7 (0)
Balonização hepatocelular n (%)	
Discreta	5/20 (25)
Moderada	7/20 (35)
Intensa	8/20 (40)
Inflamação lobular n (%)	
Discreta	7/20 (35)
Moderada	10/20 (50)
Intensa	3/20 (15)
Inflamação portal n (%)	
Discreta	14/19 (73,7)
Moderada	3/19 (15,8)
Intensa	2/19 (10,5)
Fibrose perissinusoidal n (%)	
Discreta	13/20 (65)
Moderada	6/20 (30)
Intensa	1/20 (5)
Fibrose portal n (%)	
Discreta	7/9 (78)
Moderada	1/9 (11)
Intensa	1/9 (11)
Fibrose septal n (%)	
Discreta	1/2 (50)
Moderada	0/2 (0)
Intensa	1/2 (50)

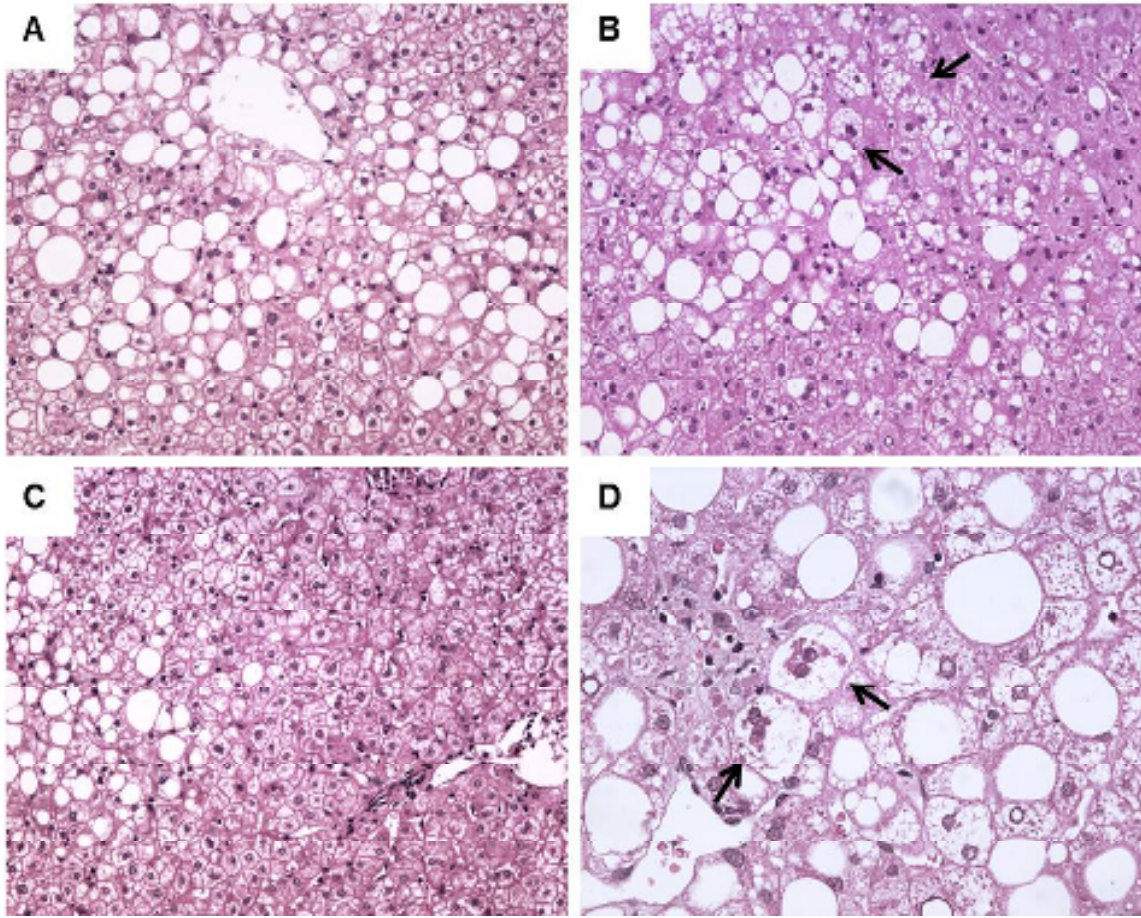


Figura 8: Alterações celulares em fígados de pacientes obesos. Fígados de pacientes obesos foram avaliados quanto à presença de alterações celulares características da NAFLD. (A) Esteatose macrovacuolar (H&E, 200x); (B) Esteatose microvacuolar (H&E, 200x); (C) Balonização hepatocelular (H&E, 200x); (D) Hepatócitos contendo corpúsculos de Mallory-Denk são visualizados (setas) (H&E, 400x).

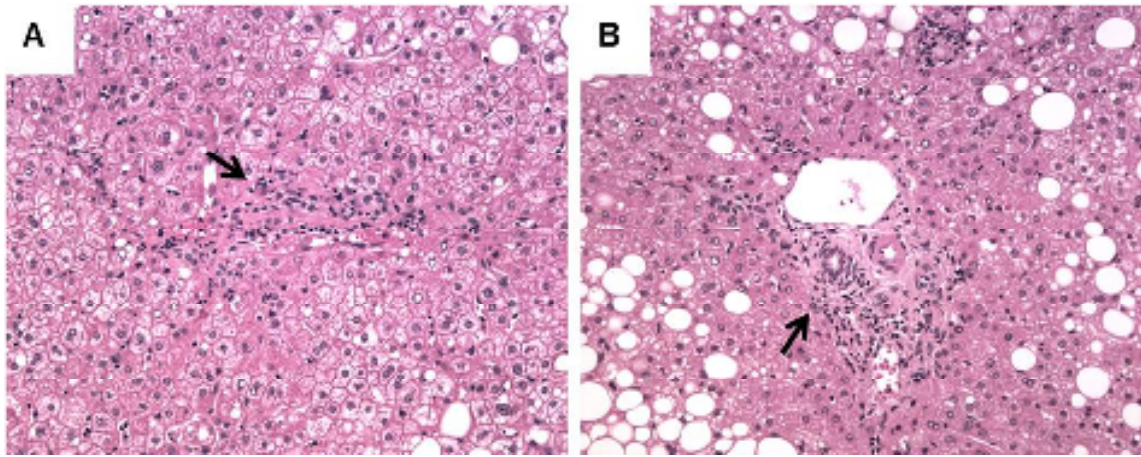


Figura 9: Inflamação lobular e inflamação portal em fígados de pacientes obesos. Fígados de pacientes obesos foram avaliados quanto à presença das inflamações lobular e portal. (A) Inflamação lobular. Detalhe do foco inflamatório (seta) (H&E, 200x); (B) Inflamação portal. Detalhe do foco inflamatório (seta) (H&E, 200x).

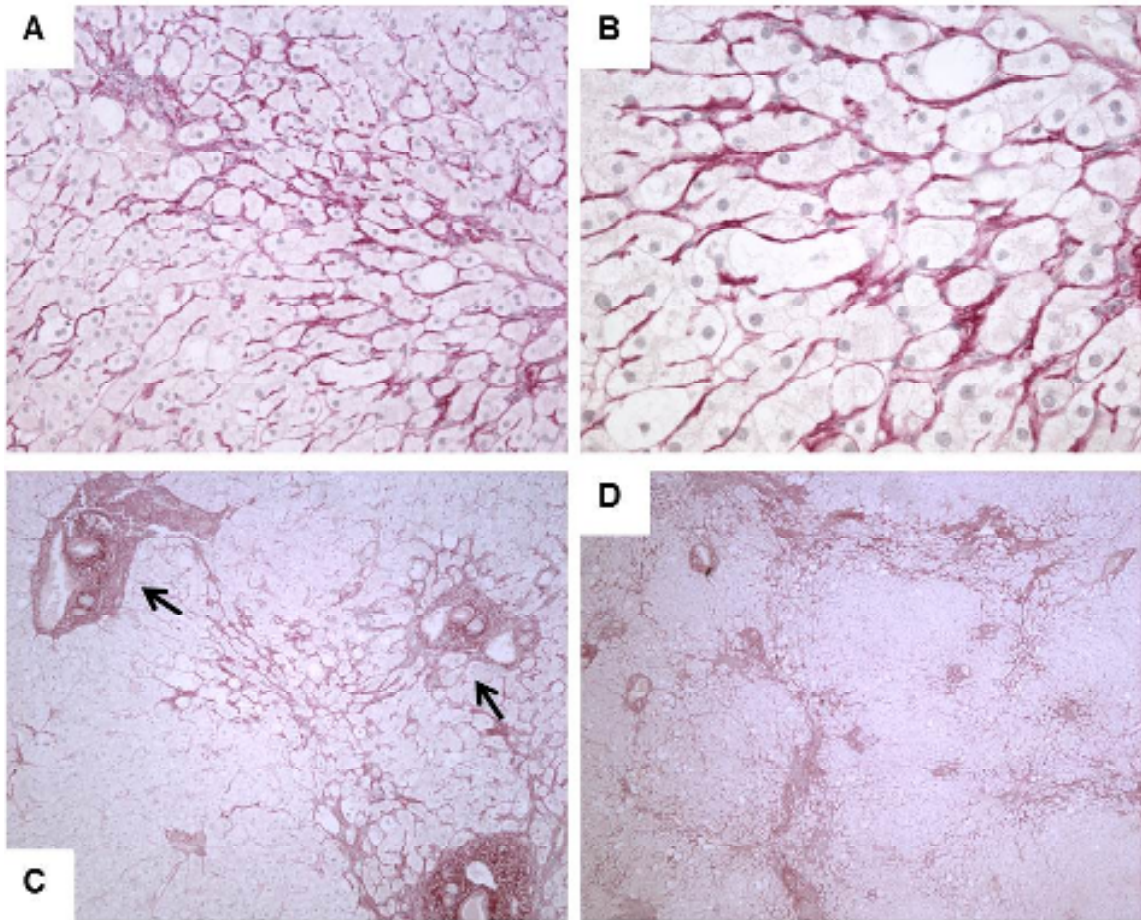


Figura 10: Fibrose em fígados de pacientes obesos. Fígados de pacientes obesos foram avaliados quanto à presença das fibroses perissinusoidal, portal e septal. (A) Fibrose perissinusoidal (*Picrossirius Red*, 200x); Em B, fibrose perissinusoidal em maior aumento (*Picrossirius Red*, 400x); (C) Fibrose portal (*Picrossirius Red*, 100x); (D) Fibrose septal (*Picrossirius Red*, 100x).

5.2.10. Presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em pacientes obesos

Para avaliar a presença de células estelares ativadas e de células progenitoras hepáticas em fígados de pacientes obesos, a expressão *in situ* da alfa-actina de músculo liso e desmina, e da citoqueratina 7 e citoqueratina 19 foi avaliada.

Fígados de todos os pacientes obesos apresentaram células expressando alfa-actina de músculo liso (Tabela 8). Estas células apresentavam-se fusiformes e se distribuíam pelo parênquima hepático (Fig. 11). A marcação foi, em sua maioria, de intensidade discreta (58% dos casos), mas alguns casos exibiram marcação moderada (21%) e intensa (21%) (Tabela 9). Células expressando desmina não foram observadas em fígados de indivíduos obesos (Tabela 8 e Fig. 12).

Células positivas para citoqueratina 7 foram observadas em fígados de 89,5% dos pacientes obesos avaliados (Tabela 8). Estas células estavam presentes próximas aos ductos biliares e se distribuíam pelo parênquima hepático (Fig. 13) A intensidade da marcação para citoqueratina 7 foi discreta em 82,4% dos casos e moderada em 17,6% dos casos (Tabela 9).

A frequência de pacientes que exibiram, em seus fígados, células expressando citoqueratina 19 foi de 89,5%, semelhante à frequência observada na marcação para citoqueratina 7 (Tabela 8). Do mesmo modo que as células positivas para citoqueratina 7, as células positivas para citoqueratina 19 estavam presentes próximas aos ductos biliares e se distribuíam pelo parênquima hepático (Fig. 14). Quando presente, a marcação foi de intensidade discreta em 88,2% dos casos e moderada em 11,8% dos casos (Tabela 9).

Tabela 8: Imunomarcações em fígados de pacientes obesos

Imunomarcação	Pacientes obesos n=19
Citoqueratina 7 n (%)	
Presente	17 (89,5)
Ausente	2 (10,5)
Citoqueratina 19 n (%)	
Presente	17 (89,5)
Ausente	2 (10,5)
Alfa actina de músculo liso n (%)	
Presente	19 (100)
Ausente	0 (0)
Desmina n (%)	
Presente	0 (0)
Ausente	19 (100)

Tabela 9: Intensidade das imunomarcações em fígados de pacientes obesos

Imunomarcação	Pacientes obesos
Citoqueratina 7 n (%)	
Discreta	14/17 (82,4)
Moderada	3/17 (17,6)
Intensa	0/17 (0)
Citoqueratina 19 n (%)	
Discreta	15/17 (88,2)
Moderada	2/17 (11,8)
Intensa	0/17 (0)
Alfa actina de músculo liso n (%)	
Discreta	11/19 (58)
Moderada	4/19 (21)
Intensa	4/19 (21)

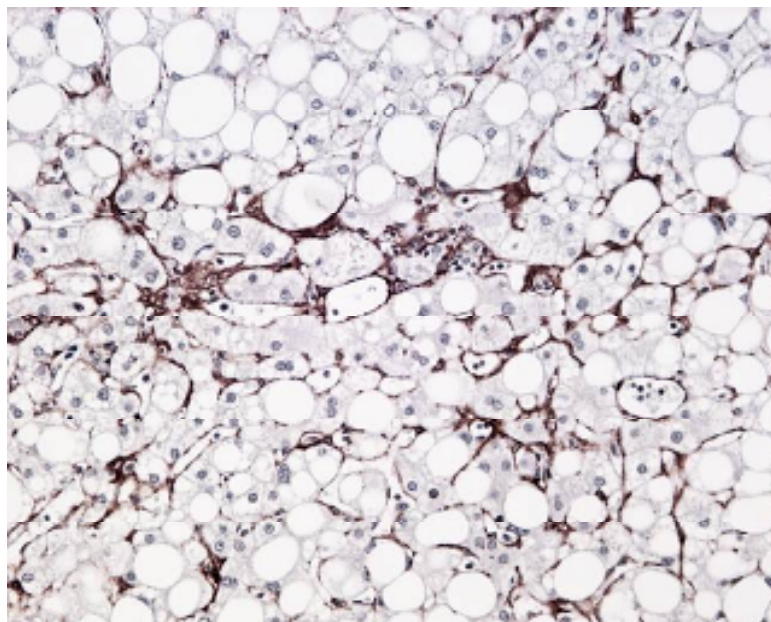


Figura 11: Expressão de alfa-actina de músculo liso em fígados de pacientes obesos. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de pacientes obesos, utilizando a técnica da imunohistoquímica indireta. Fígado de paciente obeso apresentando várias células positivas para alfa-actina de músculo liso (200x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 6.

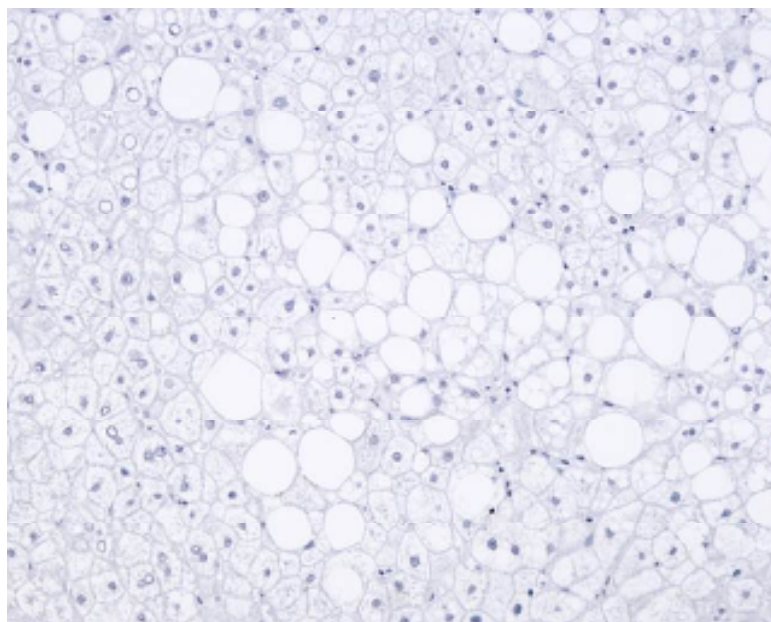


Figura 12: Expressão de desmina em fígados de pacientes obesos. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de pacientes obesos, utilizando a técnica da imunohistoquímica indireta. Fígado de paciente obeso sem células positivas para desmina (200x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 7.

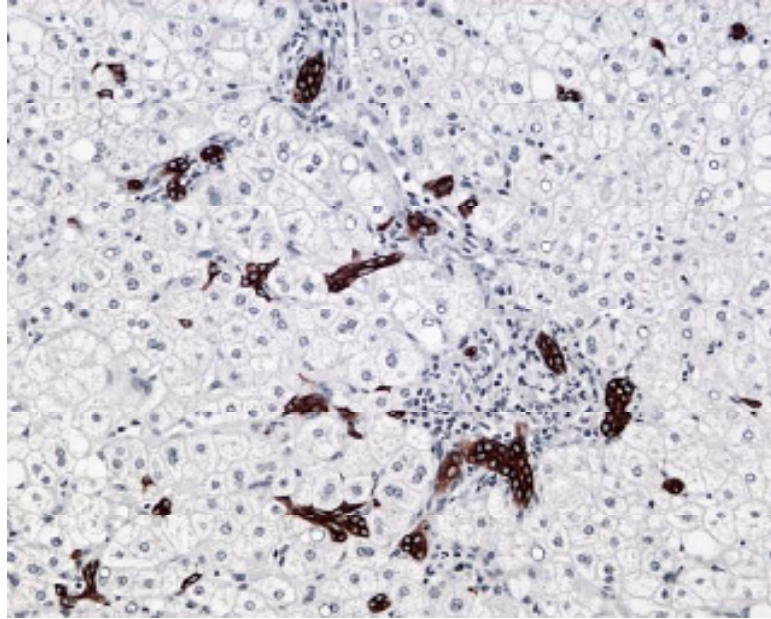


Figura 13: Expressão de citoqueratina 7 em fígados de pacientes obesos. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de pacientes obesos, utilizando a técnica da imunohistoquímica indireta. Fígado de paciente obeso apresentando várias células positivas para citoqueratina 7 (200x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 8.

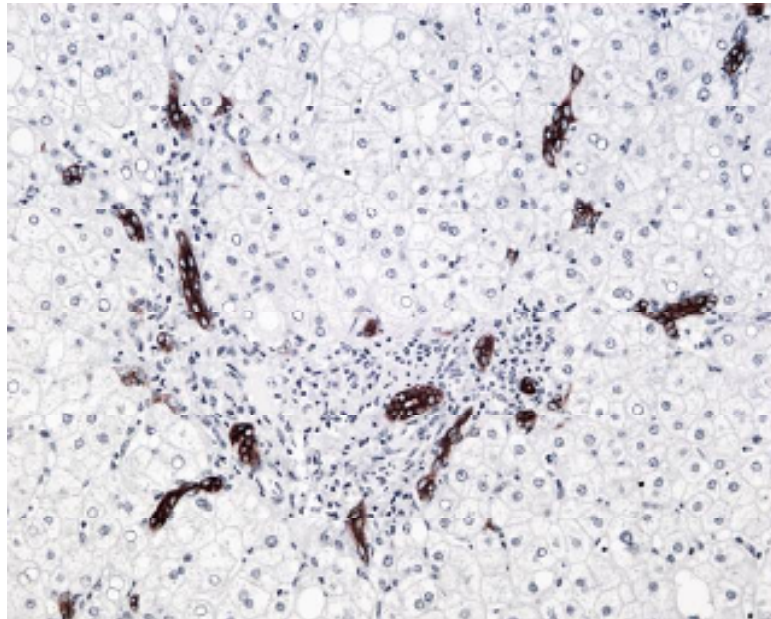


Figura 14: Expressão de citoqueratina 19 em fígados de pacientes obesos. Foram realizadas imunomarcações, em fígados de pacientes obesos, utilizando a técnica da imunohistoquímica indireta. Fígado de paciente obeso apresentando várias células positivas para citoqueratina 19 (200x). Os controles positivo e negativo da reação estão em Anexo 9.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos em fígados de camundongos alimentados com a dieta HF e em fígados de pacientes obesos, notou-se que:

- Todos os camundongos alimentados com a dieta HF e todos os pacientes obesos exibiram esteatose macrovacuolar, balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose perissinusoidal (Tabela 10)
- Em camundongos, a inflamação portal e a fibrose septal foram observadas somente no grupo de 10 meses de dieta HF
- A esteatose microvacuolar foi mais comum no grupo de 10 meses de dieta HF do que no grupo de 8 meses de dieta HF
- A esteatose macrovacuolar, a inflamação lobular e a fibrose perissinusoidal foram mais intensas no grupo de 10 meses de dieta HF, quando comparado ao grupo de 8 meses de dieta HF
- Células positivas para actina alfa de músculo liso foram observadas em fígados de todos os camundongos alimentados com a dieta HF e em todos os pacientes obesos (Tabela 11)
- Em camundongos, células positivas para desmina foram observadas somente no grupo de 10 meses de dieta HF. Estas células não foram observadas em pacientes obesos.
- Células positivas para citoqueratinas 7 e 19 foram observadas em fígados de camundongos alimentados com a dieta HF e em fígados de pacientes obesos

Tabela 10: Presença de alterações hepáticas em camundongos HFD e em pacientes obesos

Alteração hepática	Camundongos HFD (8 meses) n=9	Camundongos HFD (10 meses) n=11	Pacientes obesos n=20
Esteatose macrovacuolar n (%)	9 (100)	11 (100)	20 (100)
Esteatose microvacuolar n (%)	5 (55,6)	11 (100)	7 (35)
Balonização hepatocelular n (%)	9 (100)	11 (100)	20 (100)
Mallory-Denk n (%)	9 (100)	11 (100)	6 (30)
Inflamação lobular n (%)	9 (100)	11 (100)	20 (100)
Inflamação portal n (%)	0 (0)	11 (100)	19 (95)
Fibrose perissinusoidal n (%)	9 (100)	11 (100)	20 (100)
Fibrose portal n (%)	0 (0)	0 (0)	9 (45)
Fibrose septal n (%)	0 (0)	3 (27,3)	2 (10)

Tabela 11: Presença de imunomarcações em fígado de camundongos HFD e em fígado pacientes obesos

Imunomarcação	Camundongos HFD (8 meses) n=9	Camundongos HFD (10 meses) n=11	Pacientes obesos n=19
Citoqueratina 7 n(%)	6 (66,7)	11 (100)	17 (89,5)
Citoqueratina 19 n (%)	9 (100)	11 (100)	17 (89,5)
Actina alfa de músculo liso n (%)	9 (100)	11(100)	19 (100)
Desmina n (%)	0 (0)	8 (72,7)	0 (0)

7. DISCUSSÃO

O número crescente de indivíduos obesos, principalmente em países ocidentais, tem refletido no aumento de indivíduos com NAFLD. Com isso, a NAFLD tem se tornado a doença crônica hepática mais prevalente no mundo (LAZO & CLARK, 2008; YOUNOSSI *et al.*, 2011). Os mecanismos envolvidos na progressão da NAFLD a partir da esteatose simples até a NASH ainda não são completamente entendidos. Neste contexto, os modelos murinos têm se tornado importantes ferramentas na elucidação destes mecanismos. O presente estudo busca validar um modelo murino de NAFLD a partir de comparações das alterações hepáticas histológicas entre estes camundongos alimentados com dieta HF e pacientes obesos.

Os pacientes incluídos nesse estudo apresentavam um conjunto de sinais sugestivos de NAFLD: i) exibiam obesidade (IMC maior ou igual a 30 Kg/m²); ii) a maioria desses pacientes (70%) exibia sinais de resistência à insulina; iii) não haviam ingerido quantidade significativa de álcool (maior que 20g por dia) e iv) apresentavam testes negativos para hepatites B e C (GOUVEIA, 2006). A análise histopatológica revelou presença de esteatose macrovacuolar, balonização hepatocelular, inflamação lobular e fibrose perissinusoidal nos fígados de todos os pacientes obesos. A esteatose, comprometendo mais de 5% dos hepatócitos, é considerada o critério histológico mínimo para o diagnóstico da NAFLD. Para o diagnóstico de NASH são requeridas, além da esteatose, lesão hepatocelular e inflamação lobular (BRUNT & TINIAKOS, 2010). Desse modo, a presença da esteatose macrovacuolar já inclui estes pacientes obesos como portadores da NAFLD. Adicionalmente, a presença de lesão hepatocelular, representada por balonização, e a presença da inflamação lobular os caracterizam como portadores de NASH.

No presente estudo, foi feita a análise histopatológica do fígado de camundongos alimentados com a dieta HF, que exibiam obesidade progressiva e resistência à insulina (KIPERSTOK, 2010). Do mesmo modo que o observado em pacientes obesos, os fígados de todos os camundongos alimentados com a dieta HF, durante oito ou 10 meses, exibiram esteatose macrovacuolar, demonstrando que estes animais desenvolveram a NAFLD. Além disso, todos apresentaram balonização hepatocelular, inflamação lobular, corpúsculos de Mallory-Denk e

fibrose perissinusoidal. Estes dados demonstram que a dieta utilizada induziu NASH, um estágio mais avançado do espectro da NAFLD, e ainda, que há progressão para fibrose.

O modelo murino proposto neste estudo apresenta algumas vantagens em relação a outros modelos da NAFLD. A indução da NAFLD nestes animais não se baseia em modificações genéticas, como em camundongos *ob/ob* e camundongos *db/db*, os quais apresentam deficiência da leptina e do receptor da leptina, respectivamente (FRIEDMAN *et al.*, 1991; TARTAGLIA *et al.*, 1995; LARTER & YEH, 2008). Tais modificações, apesar de serem espontâneas, são incomuns em humanos. Além disso, camundongos *ob/ob* e *db/db* desenvolvem esteatose mas não progridem para NASH espontaneamente. De acordo com a hipótese estabelecida por Day e James (1998), a NASH se desenvolve a partir de dois “*hits*”. O primeiro é a esteatose, e o segundo, o estresse oxidativo, que desencadeia a lesão hepatocelular e a inflamação. O segundo “*hit*” poderia ser exposição a endotoxinas ou a alimentação com dieta MCD (YANG *et al.*, 1997; WORTHAM *et al.*, 2008). No presente estudo, os camundongos alimentados com a dieta HF desenvolveram NASH espontaneamente e isso já é constatado a partir do oitavo mês de dieta. Neste modelo, a doença progride para NASH espontaneamente sem os animais terem sido submetidos a um segundo estímulo exógeno. Os fatores envolvidos na progressão da esteatose para NASH neste modelo são desconhecidos. Estudos de *follow up* a partir do início da indução da dieta, desde o desenvolvimento da esteatose, até o desenvolvimento de NASH, seriam interessantes para avaliar quais mecanismos estão envolvidos nesta progressão.

Outra vantagem do modelo murino de indução de obesidade utilizado no presente estudo, é que a dieta utilizada não apresenta déficit de nutrientes importantes como, por exemplo, a metionina e colina. Camundongos alimentados com dieta MCD têm sido utilizados como modelos de NAFLD, entretanto, dietas deficientes em metionina e colina não simulam a dieta ingerida por humanos. Além disso, estes animais são caquéticos e mais sensíveis à insulina, condição oposta à observada em pacientes com NAFLD (RINELLA & GREEN, 2004). Quando comparado a outros estudos que também utilizaram dietas HF, o presente modelo também exhibe vantagens. Deng e colaboradores (2005) obtiveram camundongos obesos e resistentes à insulina, apresentando NASH em metade dos animais avaliados. Entretanto, a dieta HF líquida foi administrada à força através de sondas

intragástricas com saída no dorso do animal, que mantinham os animais continuamente ligados a tubos. Esta metodologia requer maior habilidade do manipulador e equipamentos específicos, além disso, gera desconforto aos animais. No presente estudo, os animais se alimentaram *ad libitum*, mantendo seus hábitos normais. Em outro modelo utilizando dieta HF, Ito e colaboradores (2007) obtiveram camundongos obesos e com hiperinsulinemia. Estes animais exibiram NASH, após 35 semanas de dieta, e fibrose, após a quinquagésima semana. Em nosso modelo, a NASH e a fibrose hepática já foram observadas a partir da trigésima segunda semana (oito meses) de dieta HF. Desse modo, foi possível acompanhar as alterações histopatológicas que ocorrem durante a NAFLD, inclusive com progressão para formas mais graves em menos tempo. Isso é importante, pois reduz o tempo de experimentação.

Apesar de ambos os grupos de animais que receberam a dieta HF (oito ou 10 meses) exibirem esteatose macrovacuolar, inflamação lobular e fibrose perissinusoidal, pôde-se observar que tais alterações foram mais intensas no grupo de 10 meses do que no grupo de oito meses. A esteatose microvacuolar foi um achado mais comum no grupo de 10 meses de dieta HF, quando comparado ao grupo de oito meses, e a inflamação portal e a fibrose septal foram outras alterações encontradas somente nos camundongos do grupo de 10 meses de dieta HF. A presença da esteatose microvacuolar tem sido descrita como um sinal de gravidade da NAFLD, já que, em geral, acompanha alterações como balonização, inflamação e fibrose (TANDRA *et al.*, 2011). Este tipo de alteração microvacuolar tem sido atribuída a defeito na β -oxidação mitocondrial (FROMENTY *et al.*, 1997). Do mesmo modo, dados recentes sugerem que a inflamação portal, em pacientes não tratados, pode representar um estágio mais avançado da NAFLD (BRUNT *et al.*, 2009). A partir desses dados, sugere-se que a manutenção da dieta HF por 10 meses leva à progressão da NAFLD, resultando em maior gravidade da doença. Nos pacientes obesos avaliados, a esteatose microvacuolar só foi observada em 35% dos casos. Por outro lado, a inflamação portal foi observada em 95% dos pacientes avaliados.

Os corpúsculos de Mallory-Denk estiveram presentes em fígados de todos os camundongos alimentados com a dieta HF, de oito ou 10 meses. Entretanto, apenas 30% dos pacientes obesos exibiram corpúsculos de Mallory-Denk. A presença de corpúsculos de Mallory-Denk não é requerida para o diagnóstico de NAFLD ou NASH, mas é um achado histológico que reforça o diagnóstico (BRUNT & TINIAKOS,

2010). Esses corpúsculos refletem alterações em proteínas do citoesqueleto e são descritos em condições que cursam com estresse oxidativo, como na doença alcoólica do fígado e na Doença de Wilson, que cursa com acúmulo de cobre intracelular.

Pacientes com NAFLD podem desenvolver fibrose e progredir para o desenvolvimento de cirrose, e, até mesmo, carcinoma hepatocelular (MATTEONI *et al.*, 1999). Neste estudo, avaliamos a presença das células estelares hepáticas ativadas e das células progenitoras hepáticas, que são as principais células envolvidas na fibrogênese hepática e no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, respectivamente (FRIEDMAN *et al.*, 1985; ROSKAMS, 2006).

As células estelares hepáticas são as principais células produtoras de colágeno durante a fibrogênese hepática e, quando ativadas, adquirem fenótipo de miofibroblasto e passam a expressar alfa-actina de músculo liso. Neste contexto, a expressão da alfa-actina de músculo liso tem sido adotada como marcador de células estelares hepáticas ativadas (MANN & SMART, 2002). No presente estudo, o fígado de todos os pacientes obesos exibiu células estelares hepáticas ativadas, evidenciadas pela expressão *in situ* da alfa-actina de músculo liso. Do mesmo modo que o observado em pacientes obesos, células estelares ativadas foram observadas nos fígados de todos os camundongos alimentados com a dieta HF, sejam do grupo de oito ou do grupo de 10 meses. Entretanto, estas células também estavam presentes em fígados de alguns camundongos do grupo controle. Apesar disso, nota-se que a proporção de células estelares ativadas foi maior nos grupos de dieta HF (principalmente no grupo de 10 meses), quando comparada a do grupo controle. Este dado, em conjunto com o dado de que a fibrose é mais intensa no grupo de 10 meses de dieta HF, reforçam a relação entre a presença de células estelares ativadas e a fibrogênese hepática, e isso foi demonstrado em alguns estudos (FELDSTEIN *et al.*, 2005; SCHMITT-GRÄFF *et al.*, 1991). Feldstein e colaboradores (2005) demonstraram que pacientes com NAFLD que apresentavam fibrose exibiam mais células estelares ativadas do que pacientes com NAFLD que não exibiam fibrose. Estas células foram evidenciadas pela expressão da alfa-actina de músculo liso e os autores sugerem que o aumento do número de células estelares ativadas pode ser utilizado como preditor de progressão da NAFLD. Além da NAFLD, o aumento do número de células estelares ativadas também já foi descrito em fígado de pacientes com outras doenças hepáticas que exibem fibrose,

como a hepatite alcoólica e a congestão crônica hepática, quando comparado a fígado de pacientes normais (SCHMITT-GRÄFF *et al.*, 1991). Recentemente, Puche e colaboradores (2012) propuseram um modelo murino deficiente em células estelares hepáticas ativadas. Os autores observaram que a ausência destas células reduz a fibrose hepática. Em conjunto, estes dados reforçam o envolvimento das células estelares ativadas no desenvolvimento da fibrose hepática. Em nosso modelo, observamos a ativação destas células, o que foi semelhante ao observado em pacientes obesos. Esse achado é muito importante, pois sugere uma convergência nos mecanismos de fibrogênese hepática e poderá ser explorado na compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação da fibrogênese na obesidade e resistência à insulina.

Um achado interessante encontrado em fígado de camundongos alimentados com dieta HF e em fígado de pacientes obesos é que algumas células ductulares foram positivas para alfa-actina de músculo liso (dado não mostrado). Os colangiócitos são células epiteliais, as quais expressam citoqueratinas. A presença de alfa-actina de músculo liso em colangiócitos sugere a ocorrência da transição epitelial-mesenquimal nestas células, já que a alfa-actina de músculo liso é um marcador de miofibroblastos (PINZANI, 2011). Alguns dados da literatura demonstram que os colangiócitos podem sofrer transição epitelial-mesenquimal em situações de lesão hepática e, ainda, sugerem o envolvimento da transição epitelial-mesenquimal na fibrogênese hepática (RYGIEL *et al.*, 2008; OMENETTI *et al.*, 2008). É possível que a transição epitelial-mesenquimal ocorra no presente modelo e que favoreça a fibrogênese hepática. Entretanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para confirmar a ocorrência deste processo.

Células positivas para desmina não foram observadas em fígados de pacientes obesos. Em camundongos, células expressando desmina foram encontradas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF durante 10 meses. Estas células exibiam fenótipo de miofibroblasto, apresentando citoplasmas alongados. Raríssimas células positivas para desmina (as quais não foram significantes e, por isso, não foram consideradas nas avaliações semi-quantitativas) foram observadas em fígados de camundongos alimentados com dieta HF durante 8 meses e em camundongos controle. Estas células exibiam fenótipo de células estelares não ativadas, apresentando vesículas lipídicas. Takase e colaboradores (1988) demonstraram que a expressão significativa da desmina é observada

somente em células estelares não ativadas. Entretanto, estudos que acompanharam *in vivo* a expressão da desmina e da actina em células estelares hepáticas, antes e após a indução de fibrose experimental, demonstraram que a desmina é expressa em células estelares hepáticas, desde a forma não ativada (quiescente) até a forma ativada, quando adquire fenótipo de miofibroblasto. Interessantemente, observa-se que a expressão de actina só é observada quando as células estelares exibem fenótipo de miofibroblasto (BALLARDINI *et al.*, 1988; ROCKEY *et al.*, 1992). Os estudos recentes têm utilizado a desmina como um marcador de células estelares e a alfa actina de músculo liso como um marcador específico de células estelares ativadas (D'AMBROSIO *et al.*, 2011; PUCHE *et al.*, 2012). Em conjunto, estes dados sugerem que a desmina não é um bom marcador de células estelares hepáticas ativadas e que a alfa-actina de músculo liso é o marcador mais adequado para estas células.

As células progenitoras hepáticas (ou células ovais) proliferam em resposta a danos sofridos pelo fígado e pela redução da capacidade regenerativa dos hepatócitos maduros. Quando ativadas, as células progenitoras hepáticas proliferam e podem sofrer diferenciação para hepatócitos ou colangiócitos (ROSKAMS, 2003). Estudos utilizando modelos murinos de hepatocarcinogênese demonstram que o acúmulo de células progenitoras hepáticas precede o desenvolvimento de nódulos hepáticos neoplásicos (SELL & DUNSFORD, 1989). Outro dado importante é que células progenitoras hepáticas têm maior longevidade, sendo mais susceptíveis a mutações, o que as torna células potenciais na iniciação da carcinogênese hepática. As células progenitoras hepáticas expressam marcadores fenotípicos de células ductulares, como as citoqueratinas 7 e 19 (ROSKAMS *et al.*, 1998).

No presente estudo, a presença das células progenitoras hepáticas foi avaliada a partir da imunomarcação da citoqueratina 7 e da citoqueratina 19 e foram observadas no fígado da maioria dos pacientes obesos (89%). Aparentemente, as citoqueratinas 7 e 19 foram expressas nas mesmas células. Nos fígados de camundongos alimentados com a dieta HF, também foi detectada marcação para citoqueratinas 7 e 19. Esse dado indica que nesses animais submetidos à dieta HF há detecção de células progenitoras hepáticas. Entretanto, metade dos camundongos do grupo controle também exibiram presença de células positivas para citoqueratina 7, mas não para citoqueratina 19. Apesar disso, a proporção de células progenitoras hepáticas foi maior em fígado de camundongos alimentados

com a dieta HF quando comparada à proporção em fígado de camundongos do grupo controle. Quanto à distribuição, as células progenitoras, tanto em pacientes obesos quanto em camundongos alimentados com a dieta HF, apresentaram um perfil semelhante, com as células emergindo a partir do espaço portal e se distribuindo pelo parênquima hepático. Roskams e colaboradores (2003) conduziram um estudo em pacientes com NAFLD e em dois modelos murinos da NAFLD (camundongos *ob/ob* e camundongos MCD) para avaliar o acúmulo das células progenitoras hepáticas nessas condições. Nos diferentes modelos foi detectado aumento do número de células progenitoras quando comparados aos controles, com distribuição das células similar ao observado no presente estudo. Outro dado interessante é que, em experimento realizado anteriormente pelo nosso grupo, alguns camundongos alimentados com dieta HF durante 12 meses exibiram neoplasia hepatocelular. Provavelmente, a presença dessas células progenitoras, após oito ou 10 meses de dieta HF, precedem o desenvolvimento da neoplasia nestes animais.

Alguns aspectos metodológicos do presente estudo devem ser considerados. A utilização de amostras de conveniência e de não termos biópsias hepáticas controle de indivíduos saudáveis, em razão da dificuldade de obtenção deste tipo de amostra, não nos permite aprofundar as comparações entre o modelo murino e os achados observados no tecido de pacientes obesos. Além disso, não podemos determinar a frequência dos achados, pois as amostras obtidas de pacientes obesos não são representativas da população dos indivíduos obesos.

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo demonstram que pacientes obesos e camundongos alimentados com dieta HF exibem alterações hepáticas histológicas semelhantes, às quais os incluem como portadores de NAFLD. Tais semelhanças podem refletir mecanismos patogênicos comuns. Os dados sugerem que o modelo murino de NAFLD proposto pode ser utilizado em estudos que buscam elucidar os mecanismos patogênicos envolvidos na progressão da NAFLD, já que este modelo apresenta características metabólicas e histológicas que simulam a doença humana. Estudos futuros para acompanhamento das alterações metabólicas e histológicas, mês a mês, a partir do início da dieta HF, seriam interessantes. Atualmente, existe interesse crescente em tentar compreender a contribuição da microbiota intestinal na progressão da NAFLD, tanto favorecendo a obesidade, quanto a agressão hepática (WIGG *et al.*, 2001; MIELE *et al.*, 2009).

Modelos de estudo poderão oferecer importantes informações para avaliar a evolução da NAFLD desde a esteatose até NASH, e a progressão para estágios de fibrose hepática.

8. CONCLUSÃO

- Fígados de camundongos alimentados com dieta HF exibem alterações histológicas similares às observadas em fígados de pacientes obesos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M.; SCHAFFNER, F. Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. **Am J Med**, v. 67, n. 5, p. 811-6, Nov 1979.
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 1, p. 1-16, Feb 2006.
- BACON, B. R.; FARAHVASH, M. J.; JANNEY, C. G.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1103-9, Oct 1994.
- BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 12, p. 141-79, 1994.
- BALLARDINI, G.; FALLANI, M.; BIAGINI, G.; BIANCHI, F. B.; PISI, E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, v. 56, n. 1, p. 45-9, 1988.
- BERK, P. D.; STUMP, D. D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. **Mol Cell Biochem**, v. 192, n. 1-2, p. 17-31, Feb 1999.
- BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 147-52, Jul 2004.
- BRUNT, E. M. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 3-16, 2001.
- BRUNT, E. M. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 13, n. 4, p. 533-44, Nov 2009.
- BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; WILSON, L. A.; UNALP, A.; BEHLING, C. E.; LAVINE, J. E.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Portal chronic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): a histologic marker of advanced NAFLD- Clinicopathologic correlations from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 809-20, Mar 2009.
- BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 42, p. 5286-96, Nov 14 2010.
- BUGIANESI, E.; LEONE, N.; VANNI, E.; MARCHESINI, G.; BRUNELLO, F.; CARUCCI, P.; MUSSO, A.; DE PAOLIS, P.; CAPUSSOTTI, L.; SALIZZONI, M.; RIZZETTO, M. Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 123, n. 1, p. 134-40, Jul 2002.
- CALDWELL, S.; IKURA, Y.; DIAS, D.; ISOMOTO, K.; YABU, A.; MOSKALUK, C.; PRAMOONJAGO, P.; SIMMONS, W.; SCRUGGS, H.; ROSENBAUM, N.; WILKINSON, T.; TOMS, P.; ARGO, C. K.; AL-OSAIMI, A. M.; REDICK, J. A. Hepatocellular ballooning in NASH. **J Hepatol**, v. 53, n. 4, p. 719-23, Oct 2010.

CALDWELL, S. H.; OELSNER, D. H.; IEZZONI, J. C.; HESPENHEIDE, E. E.; BATTLE, E. H.; DRISCOLL, C. J. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 664-9, Mar 1999.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 46, n. 4, p. 419-25, Aug 2002.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem Phys Lipids**, v. 157, n. 1, p. 1-11, Jan 2009.

CHARLTON, M.; KRISHNAN, A.; VIKER, K.; SANDERSON, S.; CAZANAVE, S.; MCCONICO, A.; MASUOKO, H.; GORES, G. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 301, n. 5, p. G825-34, Nov 2011.

CHEUNG, O.; SANYAL, A. J. Abnormalities of lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 28, n. 4, p. 351-9, Nov 2008.

CHITTURI, S.; ABEYGUNASEKERA, S.; FARRELL, G. C.; HOLMES-WALKER, J.; HUI, J. M.; FUNG, C.; KARIM, R.; LIN, R.; SAMARASINGHE, D.; LIDDLE, C.; WELTMAN, M.; GEORGE, J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. **Hepatology**, v. 35, n. 2, p. 373-9, Feb 2002.

CLARK, J. M.; DIEHL, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease: an underrecognized cause of cryptogenic cirrhosis. **Jama**, v. 289, n. 22, p. 3000-4, Jun 11 2003.

COOK, W. S.; JAIN, S.; JIA, Y.; CAO, W. Q.; YELDANDI, A. V.; REDDY, J. K.; RAO, M. S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-responsive genes induced in the newborn but not prenatal liver of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase null mice. **Exp Cell Res**, v. 268, n. 1, p. 70-6, Aug 1 2001.

COTRIM, H. P.; ANDRADE, Z. A.; PARANA, R.; PORTUGAL, M.; LYRA, L. G.; FREITAS, L. A. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. **Liver**, v. 19, n. 4, p. 299-304, Aug 1999.

COTRIM, H. P.; DE FREITAS, L. A.; FREITAS, C.; BRAGA, L.; SOUSA, R.; CARVALHO, F.; PARANA, R.; SANTOS-JESUS, R.; ANDRADE, Z. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. **Liver Int**, v. 24, n. 2, p. 131-5, Apr 2004.

CURZIO, M.; ESTERBAUER, H.; DIANZANI, M. U. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. **Int J Tissue React**, v. 7, n. 2, p. 137-42, 1985.

D'AMBROSIO, D. N.; WALEWSKI, J. L.; CLUGSTON, R. D.; BERK, P. D.; RIPPE, R. A.; BLANER, W. S. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24993, 2011.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, Apr 1998.

DELA PENA, A.; LECLERCQ, I.; FIELD, J.; GEORGE, J.; JONES, B.; FARRELL, G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 129, n. 5, p. 1663-74, Nov 2005.

DENG, Q. G.; SHE, H.; CHENG, J. H.; FRENCH, S. W.; KOOP, D. R.; XIONG, S.; TSUKAMOTO, H. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 905-14, Oct 2005.

DENK, H.; KREPLER, R.; LACKINGER, E.; ARTLIEB, U.; FRANKE, W. W. Immunological and biochemical characterization of the keratin-related component of Mallory bodies: a pathological pattern of hepatocytic cytokeratins. **Liver**, v. 2, n. 3, p. 165-75, Sep 1982.

DENK, H.; STUMPTNER, C.; ZATLOUKAL, K. Mallory bodies revisited. **J Hepatol**, v. 32, n. 4, p. 689-702, Apr 2000.

DIEHL, A. M. Lessons from animal models of NASH. **Hepatol Res**, v. 33, n. 2, p. 138-44, Oct 2005.

DIXON, J. B.; BHATHAL, P. S.; O'BRIEN, P. E. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. **Gastroenterology**, v. 121, n. 1, p. 91-100, Jul 2001.

DOSSING, M.; ARLIEN-SOBORG, P.; MILLING PETERSEN, L.; RANEK, L. Liver damage associated with occupational exposure to organic solvents in house painters. **Eur J Clin Invest**, v. 13, n. 2, p. 151-7, Apr 1983.

EL-ZAYADI, A. R. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 26, p. 4120-6, Jul 14 2008.

FAIN, J. N.; MADAN, A. K.; HILER, M. L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-82, May 2004.

FAN, C. Y.; PAN, J.; USUDA, N.; YELDANDI, A. V.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15639-45, Jun 19 1998.

FAN, J. G.; QIAO, L. Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 8, n. 3, p. 233-40, Jun 2009.

FELDSTEIN, A. E.; PAPOUCHADO, B. G.; ANGULO, P.; SANDERSON, S.; ADAMS, L.; GORES, G. J. Hepatic stellate cells and fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 4, p. 384-9, Apr 2005.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12737-42, Oct 26 1999.

FRANKE, W. W.; DENK, H.; SCHMID, E.; OSBORN, M.; WEBER, K. Ultrastructural, biochemical, and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. **Lab Invest**, v. 40, n. 2, p. 207-20, Feb 1979.

FRIEDMAN, J. M.; LEIBEL, R. L.; SIEGEL, D. S.; WALSH, J.; BAHARY, N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. **Genomics**, v. 11, n. 4, p. 1054-62, Dec 1991.

FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J.; BOYLES, J.; BISSELL, D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 24, p. 8681-5, Dec 1985.

FROMENTY, B.; BERSON, A.; PESSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **J Hepatol**, v. 26 Suppl 1, p. 13-22, 1997.

GARCIA-MONZON, C.; MARTIN-PEREZ, E.; IACONO, O. L.; FERNANDEZ-BERMEJO, M.; MAJANO, P. L.; APOLINARIO, A.; LARRANAGA, E.; MORENO-OTERO, R. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. **J Hepatol**, v. 33, n. 5, p. 716-24, Nov 2000.

GEORGE, J.; ROULOT, D.; KOTELIANSKY, V. E.; BISSELL, D. M. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12719-24, Oct 26 1999.

GHOLAM, P. M.; FLANCBAUM, L.; MACHAN, J. T.; CHARNEY, D. A.; KOTLER, D. P. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. **Am J Gastroenterol**, v. 102, n. 2, p. 399-408, Feb 2007.

GOUVEIA, M. C. **O fígado na obesidade. Estudo histológico de 100 biópsias de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.** Salvador, p.108p. 2006.

GREEN, R. M.; FLAMM, S. AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1367-84, Oct 2002.

HAUKELAND, J. W.; DAMAS, J. K.; KONOPSKI, Z.; LOBERG, E. M.; HAALAND, T.; GOVERUD, I.; TORJESEN, P. A.; BIRKELAND, K.; BJORO, K.; AUKRUST, P. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. **J Hepatol**, v. 44, n. 6, p. 1167-74, Jun 2006.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1125-31, May 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2409-15, May 1995.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.2010.

ITO, M.; SUZUKI, J.; TSUJIOKA, S.; SASAKI, M.; GOMORI, A.; SHIRAKURA, T.; HIROSE, H.; ISHIHARA, A.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. **Hepatology Res**, v. 37, n. 1, p. 50-7, Jan 2007.

KAIMORI, A.; POTTER, J.; KAIMORI, J. Y.; WANG, C.; MEZEY, E.; KOTEISH, A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. **J Biol Chem**, v. 282, n. 30, p. 22089-101, Jul 27 2007.

KAWAGUCHI, T.; OSATOMI, K.; YAMASHITA, H.; KABASHIMA, T.; UYEDA, K. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 6, p. 3829-35, Feb 8 2002.

KIPERSTOK, A. C. Avaliação longitudinal da função cardíaca em modelo experimental de diabetes tipo 2 induzido por dieta hipergordurosa em camundongo. Salvador, p.111. 2010.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA, J. C.; SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **J Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 429-38, Sep 2006.

KLEIN, S.; WADDEN, T.; SUGERMAN, H. J. AGA technical review on obesity. **Gastroenterology**, v. 123, n. 3, p. 882-932, Sep 2002.

KOEK, G. H.; LIEDORP, P. R.; BAST, A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 15-16, p. 1297-305, Jul 15 2011.

KOTEISH, A.; MAE DIEHL, A. Animal models of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 16, n. 5, p. 679-90, Oct 2002.

KWONG, M.; KAN, Y. W.; CHAN, J. Y. The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(l) and gss expression in mouse fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 274, n. 52, p. 37491-8, Dec 24 1999.

LACKNER, C.; GOGG-KAMERER, M.; ZATLOUKAL, K.; STUMPTNER, C.; BRUNT, E. M.; DENK, H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: the value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. **J Hepatol**, v. 48, n. 5, p. 821-8, May 2008.

LAM, T. K.; CARPENTIER, A.; LEWIS, G. F.; VAN DE WERVE, G.; FANTUS, I. G.; GIACCA, A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 5, p. E863-73, May 2003.

LARTER, C. Z.; YEH, M. M. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 11, p. 1635-48, Nov 2008.

LAZO, M.; CLARK, J. M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. **Semin Liver Dis**, v. 28, n. 4, p. 339-50, Nov 2008.

LECLERCQ, I. A.; FARRELL, G. C.; FIELD, J.; BELL, D. R.; GONZALEZ, F. J.; ROBERTSON, G. R. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. **J Clin Invest**, v. 105, n. 8, p. 1067-75, Apr 2000.

LECLERCQ, I. A.; FARRELL, G. C.; SCHRIEMER, R.; ROBERTSON, G. R. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. **J Hepatol**, v. 37, n. 2, p. 206-13, Aug 2002.

LEE, J. M.; DEDHAR, S.; KALLURI, R.; THOMPSON, E. W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J Cell Biol**, v. 172, n. 7, p. 973-81, Mar 27 2006.

LEE, K. S.; BUCK, M.; HOUGLUM, K.; CHOJKIER, M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. **J Clin Invest**, v. 96, n. 5, p. 2461-8, Nov 1995.

LETTERON, P.; FROMENTY, B.; TERRIS, B.; DEGOTT, C.; PESSAYRE, D. Acute and chronic hepatic steatosis lead to in vivo lipid peroxidation in mice. **J Hepatol**, v. 24, n. 2, p. 200-8, Feb 1996.

LEWIS, G. F.; CARPENTIER, A.; ADELI, K.; GIACCA, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, n. 2, p. 201-29, Apr 2002.

LI, D.; FRIEDMAN, S. L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 7, p. 618-33, Jul 1999.

LI, Z.; YANG, S.; LIN, H.; HUANG, J.; WATKINS, P. A.; MOSER, A. B.; DESIMONE, C.; SONG, X. Y.; DIEHL, A. M. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 37, n. 2, p. 343-50, Feb 2003.

LIMA, M. L.; MOURAO, S. C.; DINIZ, M. T.; LEITE, V. H. Hepatic histopathology of patients with morbid obesity submitted to gastric bypass. **Obes Surg**, v. 15, n. 5, p. 661-9, May 2005.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1907-17, Dec 6 2003.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T. R.; MCGILL, D. B.; OH, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin Proc**, v. 55, n. 7, p. 434-8, Jul 1980.

MAHER, J. J.; BISSELL, D. M.; FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J. Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. **J Clin Invest**, v. 82, n. 2, p. 450-9, Aug 1988.

MANN, D. A.; SMART, D. E. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. **Gut**, v. 50, n. 6, p. 891-6, Jun 2002.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETTI, S.; BUGIANESI, E.; LENZI, M.; MCCULLOUGH, A. J.; NATALE, S.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1844-50, Aug 2001.

MASORO, E. J.; CHAIKOFF, I. L.; CHERNICK, S. S.; FELTS, J. M. Previous nutritional state and glucose conversion to fatty acids in liver slices. **J Biol Chem**, v. 185, n. 2, p. 845-56, Aug 1950.

MATHUS-VLIEGEN, L.; TOOULI, J.; FRIED, M.; KHAN, A. G.; GARISCH, J.; HUNT, R.; FEDAIL, S.; STIMAC, D.; LEMAIR, T.; KRABSHUIS, J.; KAUFMANN, P.; ROBERTS, E.; RICCARDI, G. World Gastroenterology Organisation global guidelines on obesity. **J Clin Gastroenterol**, v. 46, n. 7, p. 555-61, Aug 2012.

MATTEONI, C. A.; YOUNOSSI, Z. M.; GRAMLICH, T.; BOPARAI, N.; LIU, Y. C.; MCCULLOUGH, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-9, Jun 1999.

MIELE, L.; VALENZA, V.; LA TORRE, G.; MONTALTO, M.; CAMMAROTA, G.; RICCI, R.; MASCIANA, R.; FORGIONE, A.; GABRIELI, M. L.; PEROTTI, G.; VECCHIO, F. M.; RAPACCINI, G.; GASBARRINI, G.; DAY, C. P.; GRIECO, A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 6, p. 1877-87, Jun 2009.

MOLL, R.; FRANKE, W. W.; SCHILLER, D. L.; GEIGER, B.; KREPLER, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 11-24, Nov 1982.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. **Hepatology**, v. 52, n. 2, p. 774-88, Aug 2010.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-19, May 2003.

OMENETTI, A.; PORRELLO, A.; JUNG, Y.; YANG, L.; POPOV, Y.; CHOI, S. S.; WITEK, R. P.; ALPINI, G.; VENTER, J.; VANDONGEN, H. M.; SYN, W. K.; BARONI, G. S.; BENEDETTI, A.; SCHUPPAN, D.; DIEHL, A. M. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. **J Clin Invest**, v. 118, n. 10, p. 3331-42, Oct 2008.

PAROLA, M.; PINZANI, M.; CASINI, A.; ALBANO, E.; POLI, G.; GENTILINI, A.; GENTILINI, P.; DIANZANI, M. U. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 194, n. 3, p. 1044-50, Aug 16 1993.

PEI, R. J.; DANBARA, N.; TSUJITA-KYUTOKU, M.; YURI, T.; TSUBURA, A. Immunohistochemical profiles of Mallory body by a panel of anti-cytokeratin antibodies. **Med Electron Microsc**, v. 37, n. 2, p. 114-8, Jun 2004.

PESSAYRE, D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22 Suppl 1, p. S20-7, Jun 2007.

PINZANI, M. Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: fibrogenesis or escape from death? **J Hepatol**, v. 55, n. 2, p. 459-65, Aug 2011.

PUCHE, J. E.; LEE, Y. A.; JIAO, J.; ALOMAN, C.; FIEL, M. I.; MUNOZ, U.; KRAUS, T.; LEE, T.; YEE, H. F., JR.; FRIEDMAN, S. L. A novel murine model to deplete hepatic stellate cells uncovers their role in amplifying liver damage. **Hepatology**, Sep 7 2012.

PURI, P.; BAILLIE, R. A.; WIEST, M. M.; MIRSHAHI, F.; CHOUDHURY, J.; CHEUNG, O.; SARGEANT, C.; CONTOS, M. J.; SANYAL, A. J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 46, n. 4, p. 1081-90, Oct 2007.

QI, Z.; ATSUCHI, N.; OOSHIMA, A.; TAKESHITA, A.; UENO, H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 5, p. 2345-9, Mar 2 1999.

REDLICH, C. A.; WEST, A. B.; FLEMING, L.; TRUE, L. D.; CULLEN, M. R.; RIELY, C. A. Clinical and pathological characteristics of hepatotoxicity associated with occupational exposure to dimethylformamide. **Gastroenterology**, v. 99, n. 3, p. 748-57, Sep 1990.

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

ROCKEY, D. C.; BOYLES, J. K.; GABBIANI, G.; FRIEDMAN, S. L. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 24, n. 2, p. 193-203, Apr 1992.

ROSKAMS, T. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. **J Hepatol**, v. 39, n. 3, p. 431-4, Sep 2003.

ROSKAMS, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3818-22, Jun 26 2006.

ROSKAMS, T.; DE VOS, R.; VAN EYKEN, P.; MYAZAKI, H.; VAN DAMME, B.; DESMET, V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. **J Hepatol**, v. 29, n. 3, p. 455-63, Sep 1998.

ROSKAMS, T.; YANG, S. Q.; KOTEISH, A.; DURNEZ, A.; DEVOS, R.; HUANG, X.; ACHTEN, R.; VERSLYPE, C.; DIEHL, A. M. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, p. 1301-11, Oct 2003.

RYGIEL, K. A.; ROBERTSON, H.; MARSHALL, H. L.; PEKALSKI, M.; ZHAO, L.; BOOTH, T. A.; JONES, D. E.; BURT, A. D.; KIRBY, J. A. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. **Lab Invest**, v. 88, n. 2, p. 112-23, Feb 2008.

SANYAL, A. J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1705-25, Nov 2002.

SCHATTENBERG, J. M.; SINGH, R.; WANG, Y.; LEFKOWITZ, J. H.; RIGOLI, R. M.; SCHERER, P. E.; CZAJA, M. J. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. **Hepatology**, v. 43, n. 1, p. 163-72, Jan 2006.

SCHMITT-GRAFF, A.; KRUGER, S.; BOCHARD, F.; GABBIANI, G.; DENK, H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. **Am J Pathol**, v. 138, n. 5, p. 1233-42, May 1991.

SCHREUDER, T. C.; VERWER, B. J.; VAN NIEUWKERK, C. M.; MULDER, C. J. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 16, p. 2474-86, Apr 28 2008.

SCHWIMMER, J. B.; BEHLING, C.; NEWBURY, R.; DEUTSCH, R.; NIEVERGELT, C.; SCHORK, N. J.; LAVINE, J. E. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 3, p. 641-9, Sep 2005.

SELL, S.; DUNSFORD, H. A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. **Am J Pathol**, v. 134, n. 6, p. 1347-63, Jun 1989.

STANTON, M. C.; CHEN, S. C.; JACKSON, J. V.; ROJAS-TRIANA, A.; KINSLEY, D.; CUI, L.; FINE, J. S.; GREENFEDER, S.; BOBER, L. A.; JENH, C. H. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. **J Inflamm (Lond)**, v. 8, p. 8, 2011.

SUZUKI, A.; ANGULO, P.; LYMP, J.; ST SAUVER, J.; MUTO, A.; OKADA, T.; LINDOR, K. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. **Hepatology**, v. 41, n. 1, p. 64-71, Jan 2005.

SVEGLIATI BARONI, G.; D'AMBROSIO, L.; FERRETTI, G.; CASINI, A.; DI SARIO, A.; SALZANO, R.; RIDOLFI, F.; SACCOMANNO, S.; JEZEQUEL, A. M.; BENEDETTI, A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 27, n. 3, p. 720-6, Mar 1998.

TAKASE, S.; LEO, M. A.; NOUCHI, T.; LIEBER, C. S. Desmin distinguishes cultured fat-storing cells from myofibroblasts, smooth muscle cells and fibroblasts in the rat. **J Hepatol**, v. 6, n. 3, p. 267-76, Jun 1988.

TANDRA, S.; YEH, M. M.; BRUNT, E. M.; VUPPALANCHI, R.; CUMMINGS, O. W.; UNALP-ARIDA, A.; WILSON, L. A.; CHALASANI, N. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 55, n. 3, p. 654-9, Sep 2011.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-71, Dec 29 1995.

TINIAKOS, D. G. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 6, p. 643-50, Jun 2010.

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

TUCHWEBER, B.; DESMOULIERE, A.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; RUBBIA-BRANDT, L.; GABBIANI, G. Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. **Lab Invest**, v. 74, n. 1, p. 265-78, Jan 1996.

VAUGHAN, M.; BERGER, J. E.; STEINBERG, D. Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue. **J Biol Chem**, v. 239, p. 401-9, Feb 1964.

VIDELA, L. A.; TAPIA, G.; RODRIGO, R.; PETTINELLI, P.; HAIM, D.; SANTIBANEZ, C.; ARAYA, A. V.; SMOK, G.; CSENDES, A.; GUTIERREZ, L.; ROJAS, J.; CASTILLO, J.; KORN, O.; MALUENDA, F.; DIAZ, J. C.; RENCORET, G.; PONIACHIK, J. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 5, p. 973-9, May 2009.

WANLESS, I. R.; LENTZ, J. S. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. **Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 1106-10, Nov 1990.

WELTMAN, M. D.; FARRELL, G. C.; LIDDLE, C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1645-53, Dec 1996.

WHO a. **Obesity**. Disponível em:

<http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/index.html> Acesso em: 11 jul. 2012.

WHO b. **Obesity and overweight**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Acesso em: 11 jul. 2012.

WIGG, A. J.; ROBERTS-THOMSON, I. C.; DYMOCK, R. B.; MCCARTHY, P. J.; GROSE, R. H.; CUMMINS, A. G. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, v. 48, n. 2, p. 206-11, Feb 2001.

WORTHAM, M.; HE, L.; GYAMFI, M.; COPPLE, B. L.; WAN, Y. J. The transition from fatty liver to NASH associates with SAME depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 10, p. 2761-74, Oct 2008.

XU, Z.; CHEN, L.; LEUNG, L.; YEN, T. S.; LEE, C.; CHAN, J. Y. Liver-specific inactivation of the Nrf1 gene in adult mouse leads to nonalcoholic steatohepatitis and hepatic neoplasia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 4120-5, Mar 15 2005.

YAMAGUCHI, K.; YANG, L.; MCCALL, S.; HUANG, J.; YU, X. X.; PANDEY, S. K.; BHANOT, S.; MONIA, B. P.; LI, Y. X.; DIEHL, A. M. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 45, n. 6, p. 1366-74, Jun 2007.

YAMASHITA, H.; TAKENOSHITA, M.; SAKURAI, M.; BRUICK, R. K.; HENZEL, W. J.; SHILLINGLAW, W.; ARNOT, D.; UYEDA, K. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9116-21, Jul 31 2001.

YANG, S. Q.; LIN, H. Z.; LANE, M. D.; CLEMENS, M.; DIEHL, A. M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 6, p. 2557-62, Mar 18 1997.

YEH, M. M.; BRUNT, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Pathol**, v. 128, n. 5, p. 837-47, Nov 2007.

YOUNOSSI, Z. M.; STEPANOVA, M.; AFENDY, M.; FANG, Y.; YOUNOSSI, Y.; MIR, H.; SRISHORD, M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 6, p. 524-530 e1; quiz e60, Jun 2011.

ZATLOUKAL, K.; FRENCH, S. W.; STUMPTNER, C.; STRNAD, P.; HARADA, M.; TOIVOLA, D. M.; CADRIN, M.; OMARY, M. B. From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? **Exp Cell Res**, v. 313, n. 10, p. 2033-49, Jun 10 2007.

ZATLOUKAL, K.; STUMPTNER, C.; FUCHSBICHLER, A.; FICKERT, P.; LACKNER, C.; TRAUNER, M.; DENK, H. The keratin cytoskeleton in liver diseases. **J Pathol**, v. 204, n. 4, p. 367-76, Nov 2004.

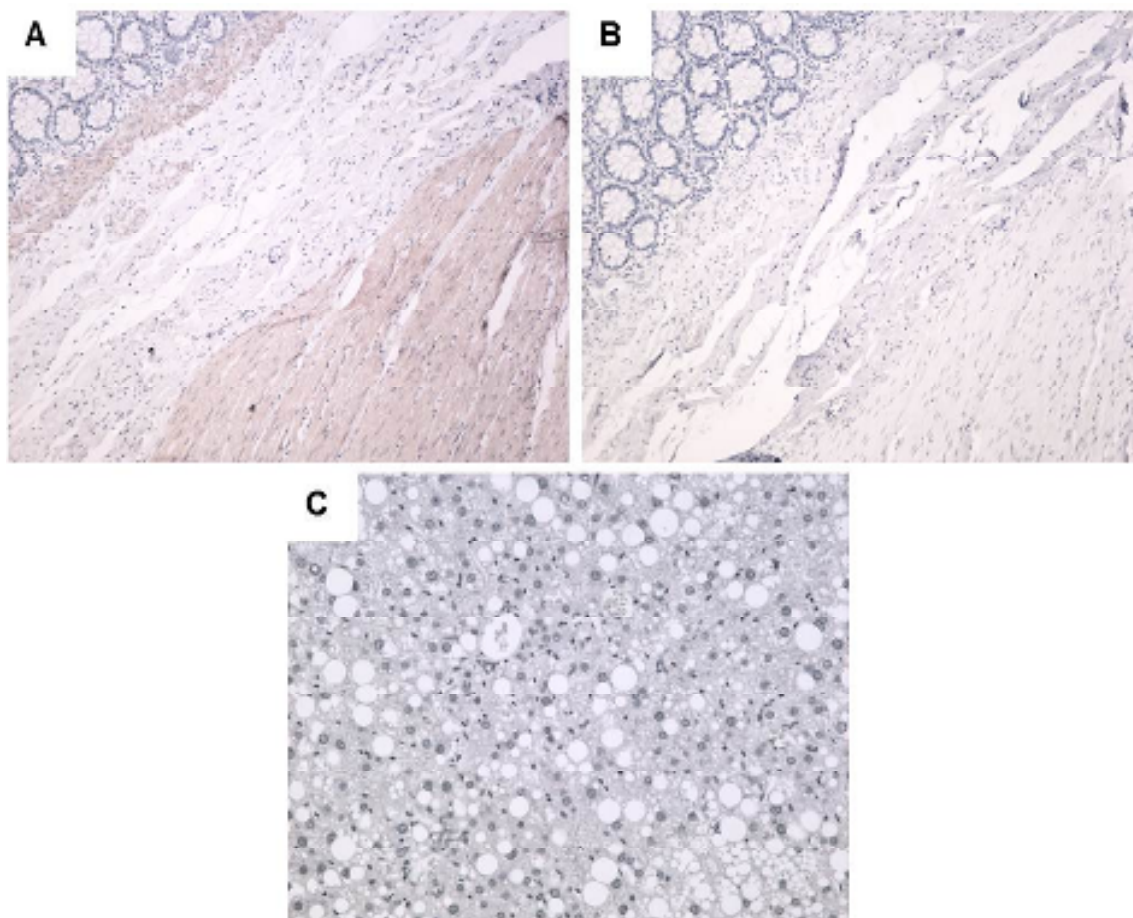
ZATLOUKAL, K.; STUMPTNER, C.; FUCHSBICHLER, A.; HEID, H.; SCHNOELZER, M.; KENNER, L.; KLEINERT, R.; PRINZ, M.; AGUZZI, A.; DENK, H. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 255-63, Jan 2002.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994.

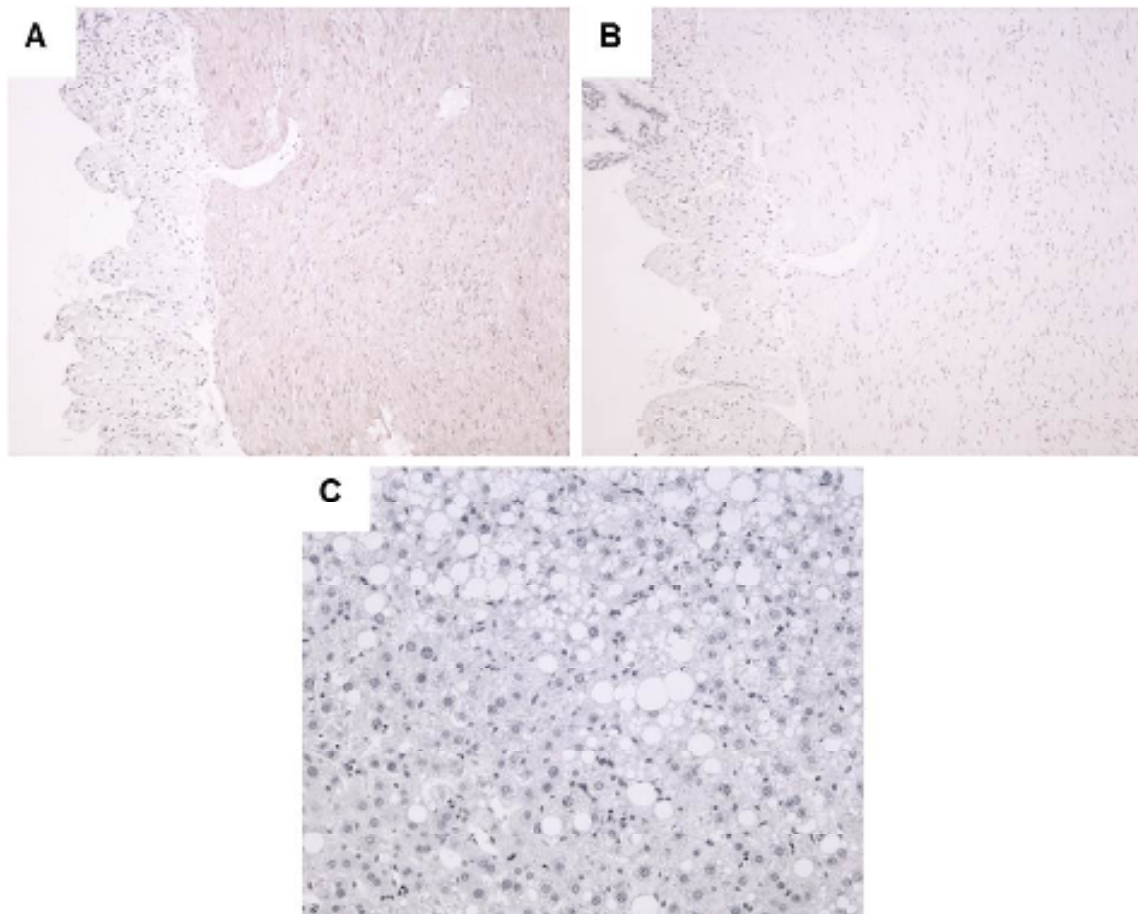
ANEXOS

Anexo 1: Dados clínicos e laboratorias dos pacientes obesos

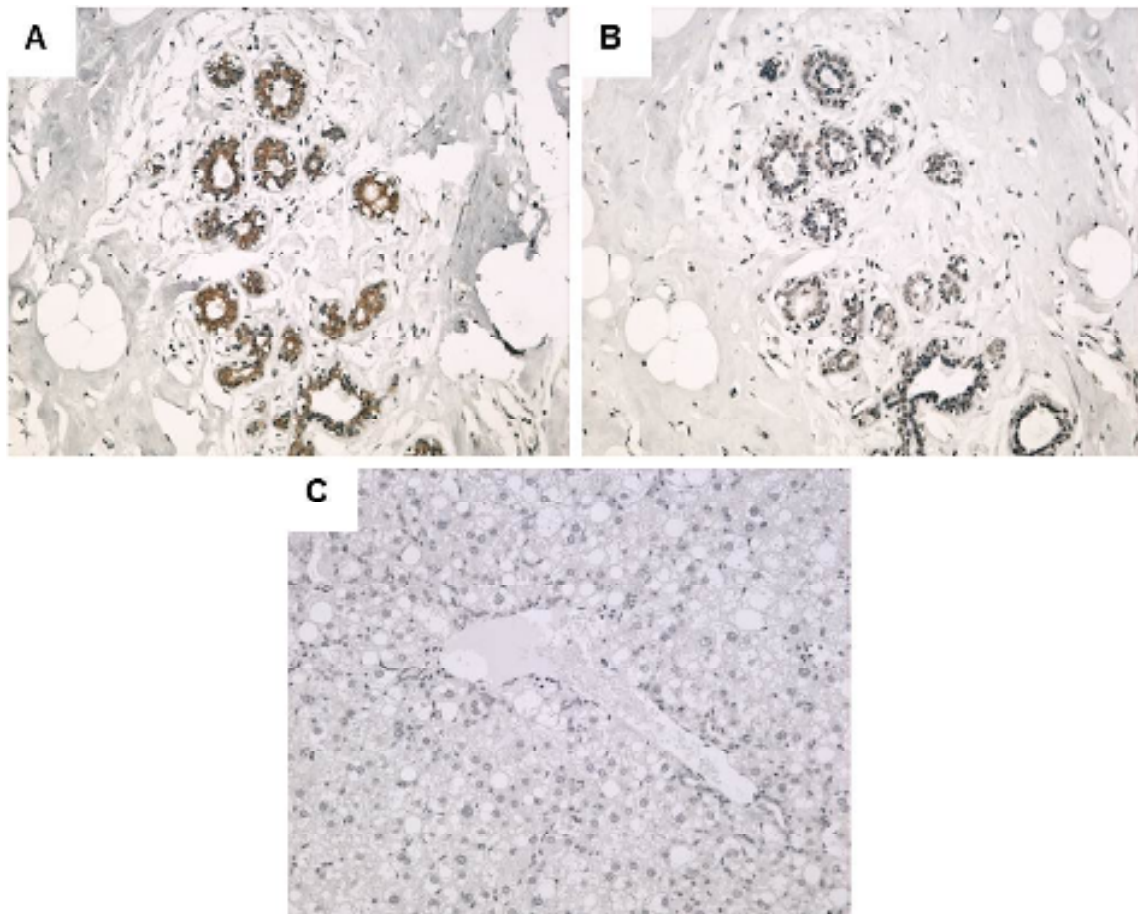
BIÓPSIA	PACIENTE	IDADE	SEXO	IMC	TGO	TGP	GGT	FA	BT	BD	PT	GLOBULINA	FERRITIN	FERRO	CT	HDL	TRIGLICE	GLICEMIA	HOMA	HAS_FINAL	DISLIPID	DM_FINAL	EXP_FINAL	DROGAS_H	ETILIS_A	SOBREC_FE
32/05	BCJB	25	F	44	31	39	26	43			6,7	2,7	27	24	250	31	249	79	4,09	S	S	N	N	N	N	
82/05	GAAN	54	F	44	27	37		102	0,55	0,02	8,2	4,0	208		188	23	209	170	6,14	S	S	S	N	N	N	
87/05	JCL	34	F	42	19	14		61	0,40	0,10	6,3	2,8	111		192	58	68	87	2,06	N	N	N	N	N	N	
100/05	SVSV	31	F	40	31	54	86	96	0,32	0,01	7,7	3,3	83	78	215	63	182	91	5,24	N	S	N	N	N	N	
194/05	ARB	36	F	44	27	26								90	150	35	268	83		N	S	N	N	N		
421/05	ACA	36	F	49	27	45	31	86	0,80	0,20	7,8	3,7	26	110	162	34	191	103	6,28	N	S	N	N	N	N	
1965/04	CRPC	38	M	45	19	44	43	111	0,59	0,06	7,1	3,2	222	104	152	35	269	89	6,67	S	S	N	N	N	N	
1998/04	APGTP	32	F	44	30	41		131			7,5	3,6		74	226	37	223	96	8,72	N	S	S	N	N	N	
1999/04	ERS	49	M	38	52	62		23	1,10	0,50	6,7	2,7	381		195	40		104	8,80	S	N	S	N	N	S	
2039/04	AMLJ	39	M	40	33	50	67	85	0,43	0,12	7,2	3,2	1.253	117	179	31	252	113	10,80	N	S	N	N	N	N	
2113/04	MLPS	45	F	59	32	36	109	139			7,2	3,5	244	73	240	33	371	270	10,80	S	S	S	N	N		
2115/04	GCSF	51	F	47	38	55	48	270			7,7	3,6	160	110	193	36	141	111	5,75	S	N	N	N	N	N	
2118/04	GCS	47	F	44	27	37	33	167	0,90	0,20	7,0	3,3	57	99	230	38	243	119	12,71	S	S	S	N	N	N	
2182/04	CMMGJ	33	F	45	20	26			0,30	0,20	6,5	3,0			211	48	161	87		S	S	N	N	N		
2212/04	GFJ	47	M	48	50	92	60	166			6,6	2,5	209	115	235	54	141	291	32,37	S	S	S	N	N	N	
2216/04	GSS	25	M	41	29	75	65	93	0,60	0,06	6,7	2,9	209	104	200	28	228	101	6,21	N	S	N	N	N	N	
2289/04	CAG	40	F	46	23	32		103	0,35	0,03	7,0	2,5	37		233	52		87	1,73	S	S	N	N	N		
2323/04	ASSL	48	F	43	30	52	32	90	0,39	0,04	7,0	3,0	46		202	18	178	121	5,72	S	S	S	N	N		
2378/04	CAB	24	F	40	34	15	26	73			6,7	3,0	26	55	217	46	85	89	1,75	N	S	N	N	N		
2379/04	DAMA	29	F	43	72	85	93	218			7,9	3,7	228	198	267	62	238	102	2,94	N	S	N	N	N	S	



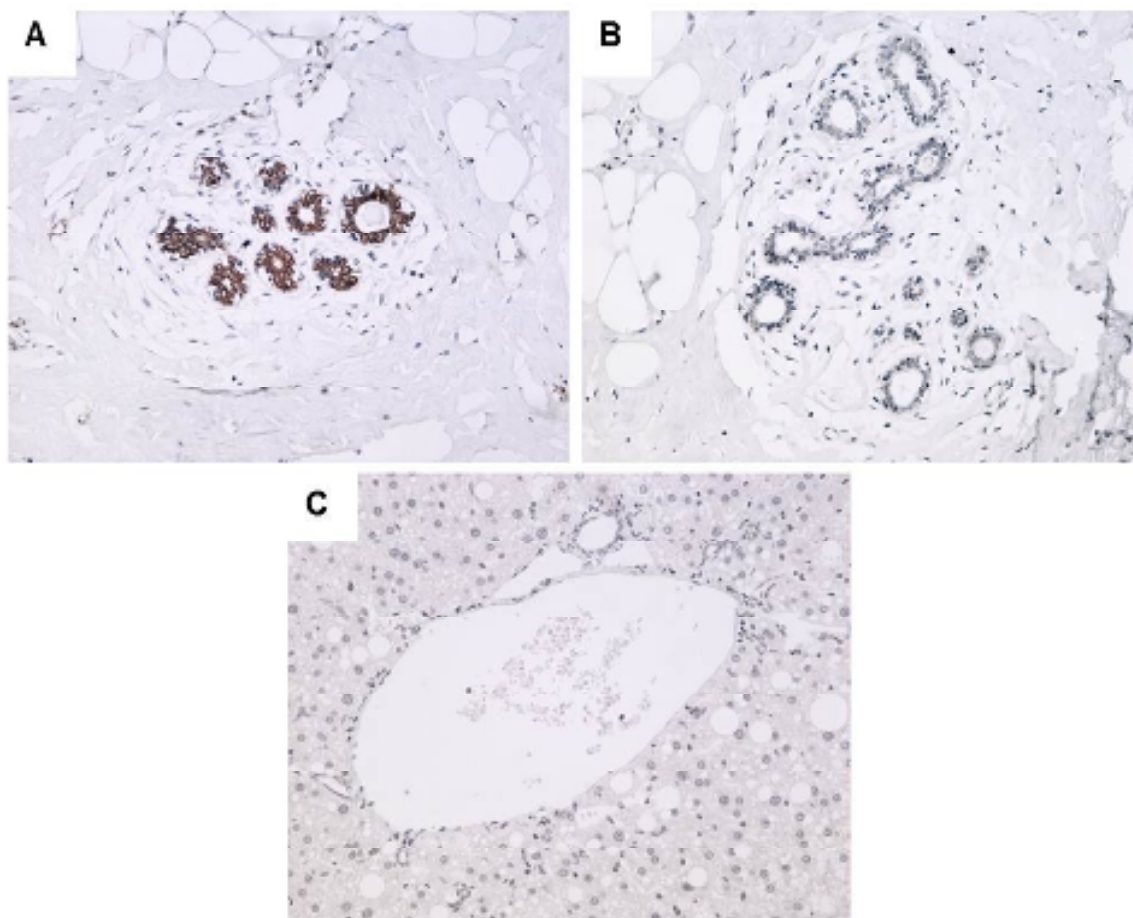
Anexo 2: Controles da imunoistoquímica da alfa actina de músculo liso em camundongos alimentados com dieta HF. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti - alfa actina de músculo liso foi intestino humano. (A) Controle positivo. Intestino incubado com anti - alfa actina de músculo liso demonstrando região muscular marcada (100x); (B) Controle negativo. Intestino incubado com IgG de coelho inespecífica demonstrando região muscular sem marcação (100x); (C) Controle negativo. Fígado de camundongo alimentado com dieta HF, incubado com IgG de coelho inespecífica, sem marcação (200x).



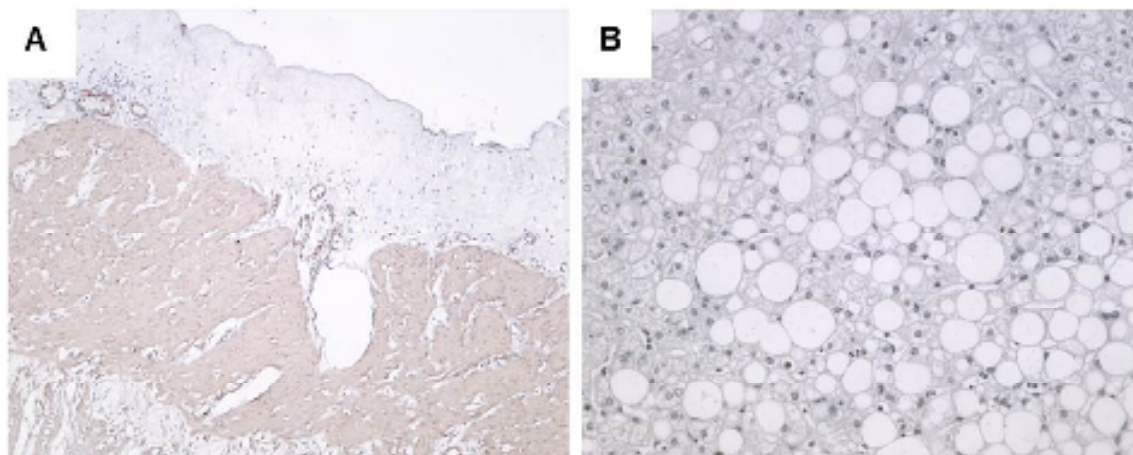
Anexo 3: Controles da imunistoquímica da desmina em camundongos alimentados com dieta HF. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti - desmina foi intestino humano. (A) Controle positivo. Intestino incubado com anti – desmina demonstrando região muscular marcada (100x); (B) Controle negativo. Intestino incubado com IgG de coelho inespecífica demonstrando região muscular sem marcação (100x); (C) Controle negativo. Fígado de camundongo alimentado com dieta HF, incubado com IgG de coelho inespecífica, sem marcação (200x).



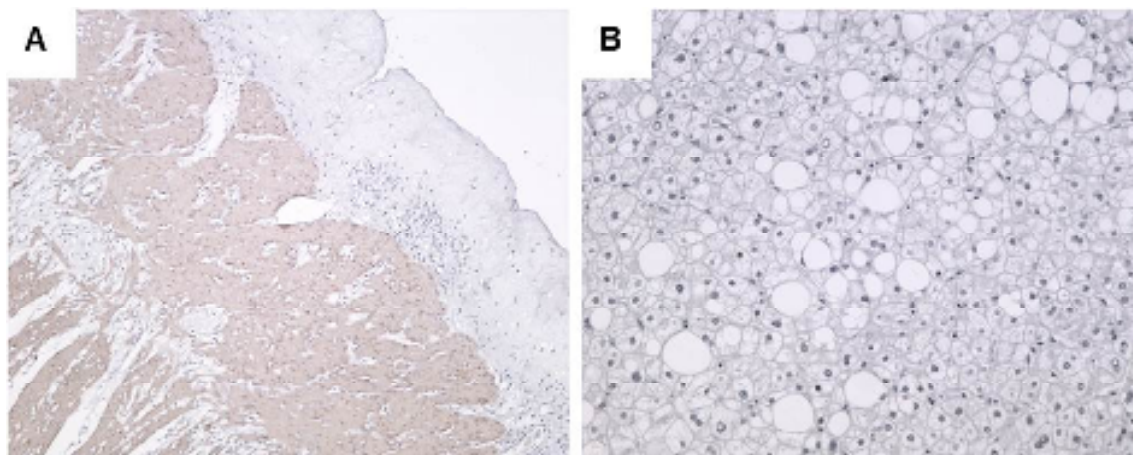
Anexo 4: Controles da imunistoquímica da citoqueratina 7 em camundongos alimentados com dieta HF. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti – citoqueratina 7 foi mama humana. (A) Controle positivo. Mama incubada com anti – citoqueratina 7 demonstrando ductos mamários marcados (200x); (B) Controle negativo. Mama incubada com IgG de coelho inespecífica demonstrando ductos mamários sem marcação (200x); (C) Controle negativo. Fígado de camundongo alimentado com dieta HF, incubado com IgG de coelho inespecífica, sem marcação (200x).



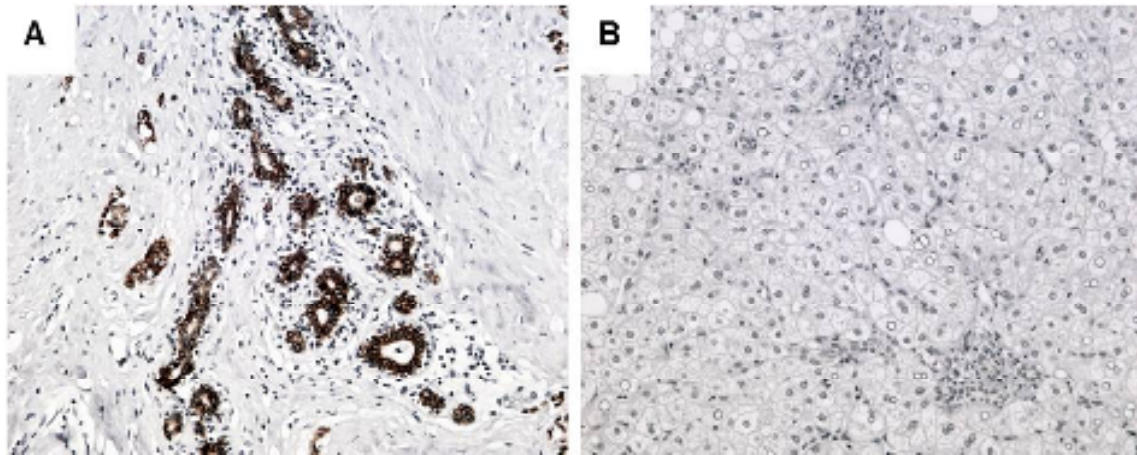
Anexo 5: Controles da imunistoquímica da citoqueratina 19 em camundongos alimentados com dieta HF. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti – citoqueratina 19 foi mama humana. (A) Controle positivo. Mama incubada com anti – citoqueratina 19 demonstrando ductos mamários marcados (200x); (B) Controle negativo. Mama incubada com IgG de coelho inespecífica demonstrando ductos mamários sem marcação (200x); (C) Controle negativo. Fígado de camundongo alimentado com dieta HF, incubado com IgG de coelho inespecífica, sem marcação (200x).



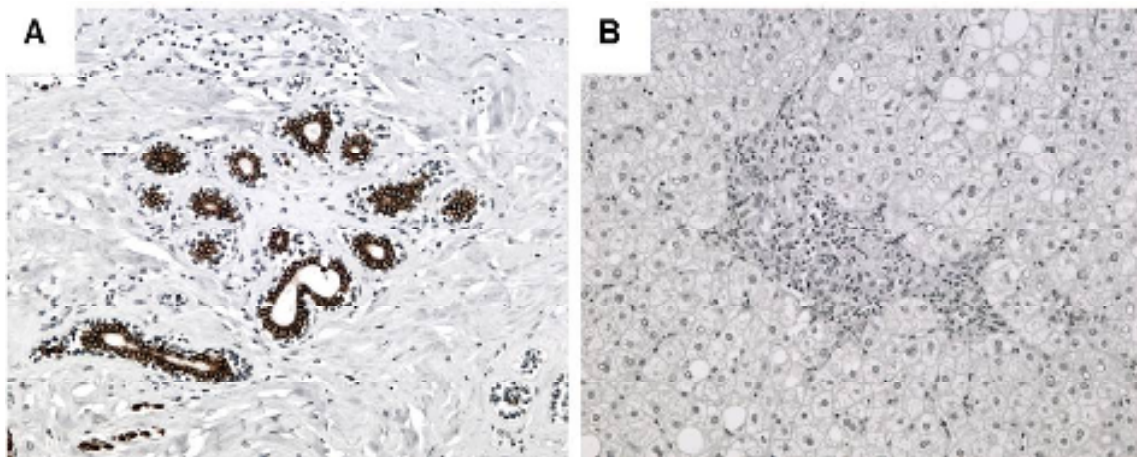
Anexo 6: Controles da imunohistoquímica da alfa actina de músculo liso em pacientes obesos. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti - alfa actina de músculo liso foi intestino humano. (A) Controle positivo. Intestino incubado com anti – alfa actina de músculo liso demonstrando região muscular marcada (100x); (B) Controle negativo. Fígado de paciente obeso, incubado com PBS 1x, sem marcação (200x).



Anexo 7: Controles da imunohistoquímica da desmina em pacientes obesos. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti - desmina foi intestino humano. (A) Controle positivo. Intestino incubado com anti – desmina demonstrando região muscular marcada (100x); (B) Controle negativo. Fígado de paciente obeso, incubado com PBS 1x, sem marcação (200x).



Anexo 8: Controles da imunohistoquímica da citoqueratina 7 em pacientes obesos. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti – citoqueratina 7 foi mama humana. (A) Controle positivo. Mama incubada com anti – citoqueratina 7 demonstrando ductos mamários marcados (200x); (B) Controle negativo. Fígado de paciente obeso, incubado com PBS 1x, sem marcação (200x).



Anexo 9: Controles da imunohistoquímica da citoqueratina 19 em pacientes obesos. O tecido utilizado como controle positivo da marcação com anti – citoqueratina 19 foi mama humana. (A) Controle positivo. Mama incubada com anti – citoqueratina 19 demonstrando ductos mamários marcados (200x); (B) Controle negativo. Fígado de paciente obeso, incubado com PBS 1x, sem marcação (200x).