

Desenvolvimento de modelo animal de doença hepática gordurosa não alcoólica: experimento piloto

Development of an animal model of non-alcoholic fatty liver disease: pilot experiment

DOI:10.34117/bjdv8n4-383

Recebimento dos originais: 21/02/2022

Aceitação para publicação: 31/03/2022

José Augusto Sales Mota

Cursando ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: joseaugustosalesmota@gmail.com

Paola Gonçalves Moreira de Oliveira

Cursando ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: paolagmoliveira@gmail.com

Ana Carla Dlugosz

Cursando ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: anacdlugosz@gmail.com

Julia Henneberg Hessman

Cursando ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: julia.hessman@gmail.com

Bruna Karas

Cursando ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: brunakaras3@gmail.com

Camilla Mattia Calixto

Cursando Ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: calixtocamilla@gmail.com

Larissa Almeida Busnello

Cursando Ensino superior

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: laribusnello@hotmail.com

Mário Cláudio Soares Sturzeneker

Doutorado

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Uvaranas, Ponta Grossa

CEP: 84030-900

E-mail: mcssturzeneker@gmail.com

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é altamente prevalente na população adulta de países desenvolvidos e tem sido relacionada significativamente com o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. A importância da pesquisa básica impõe a necessidade de modelos experimentais adequados e vários modelos tem sido propostos para a DHGNA, porém, não há modelo estabelecido como padrão até o momento. Desenvolver um modelo experimental de DHGNA em rato Wistar. Foram utilizados 16 ratos wistar, divididos em 4 grupos: grupo controle basal (CB), grupo controle normal (GN), grupo colesterol (GC) e grupo dieta hiperlipídica (DH). O grupo GN foi alimentado com ração padrão Nuvilar®, o grupo GC com ração colesterol a 3% e o grupo DH com ração hiperlipídica. Excetuando o grupo CB que foi sacrificado na linha de base, os outros foram submetidos à eutanásia na 8ª e 12ª semana. A avaliação realizada sob os critérios do sistema de score para a análise histológica da DHGNA não mostrou alterações que caracterizam o desenvolvimento da doença em nenhum animal utilizado nessa proposta de modelo experimental. Conclusão: Nenhum dos grupos desenvolveu DHGNA. O período do estudo foi possivelmente insuficiente para indução de DHGNA em ratos Wistar por meio das composições dietéticas utilizadas.

Palavras-chave: doença hepática gordurosa não alcoólica (dhgna), esteatohepatite não alcoólica, fígado gorduroso, modelo animal.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is highly prevalent in the adult population of developed countries and has been significantly related to increased mortality from cardiovascular disease. The importance of basic research imposes the need for appropriate experimental models, and several models have been proposed for NAFLD, but no standard model has been established to date. To develop an experimental model of NAFLD in Wistar rats. Methods: We used 16 wistar rats, divided into 4 groups: basal control group (CB), normal control group (NG), cholesterol group (CG) and hyperlipidic

diet group (HD). The NG group was fed with standard Nuvilar® chow, the CG group with 3% cholesterol chow, and the DH group with hyperlipidic chow. Except for the CB group which was sacrificed at baseline, the others were euthanized at week 8 and 12. The evaluation performed under the criteria of the score system for histological analysis of NAFLD showed no changes that characterize the development of the disease in any animal used in this proposed experimental model. None of the groups developed NAFLD. The study period was possibly insufficient for induction of NAFLD in Wistar rats by means of the dietary compositions used.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis, fatty liver, animal model.

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracteriza-se por um amplo espectro de danos hepáticos que varia desde esteatose isolada a esteatohepatite, fibrose avançada e cirrose (YOUNOSSI et al., 2015). É altamente prevalente na população adulta de países desenvolvidos e tem sido relacionada significativamente com o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (GINSBERG; ZHANG; HERNANDEZ-ONO, 2006; WILSON et al., 2005). Frequentemente assintomática, tem sido descrita em todas as faixas etárias e na maioria dos grupos raciais (YOUNOSSI et al., 2015). Encontra-se frequentemente associada à outras doenças significativamente prevalentes como síndrome metabólica, obesidade e diabetes mellitus tipo II (DM2) (GINSBERG; ZHANG; HERNANDEZ-ONO, 2006). Sua prevalência é estimada em 20 a 30% na população adulta em geral (HAMAGUCHI et al., 2005; YOUNOSSI et al., 2011), porém essa prevalência tem aumento significativo em obesos e em portadores de DM2 (HANLEY et al., 2005; YOUNOSSI et al., 2011). Atualmente considerada a causa mais comum de doença hepática crônica nos países ocidentais sendo possível que até 2030 se torne a indicação mais frequente de transplante de fígado (BYRNE; TARGHER, 2015).

A DHGNA é frequentemente assintomática e seu diagnóstico é geralmente sugerido por achados incidentais de métodos de imagem não invasivos. Embora tais métodos possam quantificar a esteatose, nenhum deles possibilita uma avaliação adequada do restante do espectro da doença, sendo a biópsia hepática o padrão ouro para a avaliação do estágio e grau da lesão hepática (SZCZEPANIAK et al., 2005). Seu diagnóstico é definido pela presença de esteatose hepática, evidenciada por exame de imagem ou análise histológica, na ausência de causas secundárias de acúmulo de gordura

hepática, como o consumo significativo de bebidas alcoólica e o uso prolongado de medicamentos com potencial esteatogênico (CHALASANI et al., 2018). Pode ser categorizada histologicamente como fígado gorduroso não alcoólico: presença de esteatose $\geq 5\%$ hepatócitos sem sinais de injúria hepatocelular (balonização), esteatohepatite não alcoólica (EHNA): presença de esteatose $\geq 5\%$ hepatócitos, inflamação, sinais de injúria hepatocelular com ou sem fibrose, fibrose avançada: pontes de fibrose (estágio 3), cirrose (estágio 4) (CHALASANI et al., 2018).

A importância da pesquisa básica impõe a necessidade de modelos experimentais adequados. Vários modelos experimentais tem sido propostos para a DHGNA, porém, até o momento, não há modelo estabelecido como padrão (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017). Modelos animais nos quais foram utilizados principalmente ratos e menos frequentemente coelhos com os mais variados métodos de indução de doença tem mostrado vantagens e desvantagem entre eles, tornando difícil a eleição de um modelo animal padrão (STEPHENSON et al., 2017). Levando-se em conta que o padrão ouro para o diagnóstico da DHGNA é a análise histológica via biópsia hepática (CHALASANI et al., 2018) pode-se inferir que um modelo animal com método de indução natural, com base nos fatores de risco da DHGNA, que apresente todo o espectro histopatológico da mesma (esteatose, inflamação lobular, degeneração balonizante de hepatócitos e fibrose em escores que caracterizem esteatohepatite) pode ser utilizado de forma satisfatória em experimentos no contexto da DHGNA (SANTHEKADUR; KUMAR; SANYAL, 2018).

2 OBJETIVO

Desenvolver um modelo experimental de DHGNA em rato Wistar, com método de indução natural que possa mimetizar de forma aproximada os hábitos alimentares sabidamente relacionados com o desenvolvimento dessa doença em humanos.

3 MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 16 ratos wistar, machos, adultos com 130 a 160 gramas, divididos em 4 grupos: grupo controle basal (CB- 4 ratos), grupo controle normal (GN- 4 ratos), grupo colesterol (GC- 4 ratos) e grupo dieta hiperlipídica (DH- 4 ratos). O grupo GN foi alimentado com ração padrão Nuvilar®, o grupo GC com a ração padrão citada com colesterol adicionado a 3% (ração colesterol) e o grupo DH com dieta hiperlipídica (ração hiperlipídica) desenvolvida na Universidade Estadual de Ponta Grossa (LIPINSKI

et al., 2017). Excetuando o grupo CB que foi sacrificado na linha de base (eutanásia 0), todos os animais dos outros grupos receberam as respectivas rações e água *ad libitum*, foram pesados semanalmente e submetidos a aferição de glicemia capilar a cada 2 semanas. Metade de cada grupo foi submetida à eutanásia na 8ª semana (eutanásia 1) e a outra metade na 12ª semana (eutanásia 2).

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Ambiente de experimentação

Os procedimentos foram realizados nas dependências do laboratório de técnica operatória da UEPG. No macroambiente foram respeitados os ciclos de iluminação 12/12 horas, com troca de ar contínua e temperatura controlada entre 19 a 23°C. No microambiente os animais foram mantidos em gaiolas de metal higienizadas diariamente, sendo utilizadas 3 gaiolas, uma para cada grupo estudado. Os ratos foram transferidos para o laboratório de experimentação onde permaneceram por um período de adaptação de sete dias antes do início do experimento e cada animal recebeu uma identificação de cor por grupo na cauda. Durante esse período receberam água e ração padrão para coelhos de laboratório *ad libitum*.

3.2.2 Preparo da ração colesterol

Para o preparo da ração colesterol a 3 % foram utilizados 60 g de colesterol \geq 92,5% (Sigma-Aldrich), dissolvidos em 400 ml de clorofórmio. A solução resultante foi aplicada de forma homogênea em 2 Kg de ração padrão Nuvilar® (LIPINSKI et al., 2017). Antes da utilização da ração colesterol, foi aguardado um período mínimo de 24 horas para a adequada evaporação do clorofórmio.

3.2.3 Retirada de amostras de sangue

Nas eutanásias 0, 1 e 2, após um período de jejum de doze horas, sob anestesia com xilazina 5mg/kg e cetamina 40 mg/kg via intraperitoneal, foram coletadas amostras de sangue, volume de 3 ml, por meio de punção intracardíaca para dosagens de colesterol total e triglicerídeos.

3.2.4 Ressecção e pesagem hepática

Após a tricotomia ampla do abdome que foi realizada alguns minutos após a administração da solução anestésica, os ratos foram colocados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica e seus membros fixados pelas extremidades. Em seguida, cada animal foi submetido à laparotomia mediana ampla a partir do processo xifoide. Com o campo aberto foi feita a identificação do fígado, posterior remoção e subsequente sacrifício de cada animal. Os fígados ressecados, foram pesados em balança de precisão e acondicionados frascos com solução de formaldeído.

3.2.5 Análise histológica

Para a confecção das lâminas, as amostras de tecido hepático foram submetidas à fixação em formaldeído, à inclusão em blocos de parafina e coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas de forma cega com base no sistema de escore para a análise histológica da DHGNA (KLEINER et al., 2005). A presença de esteatohepatite não alcoólica (EHNA) foi estimada pelo escore de atividade da DHGNA (EAD) que faz parte desse sistema de análise histológica. O EAD corresponde a soma não ponderada dos escores de esteatose, balonização de hepatócitos e inflamação lobular. Em estudo realizado para sua validação, o $EAD \leq 2$ correlacionou-se significativamente com a ausência de EHNA, entre 3 e 4 não teve valor discriminativo ficando distribuído de forma semelhante entre três diagnósticos (ausência de EHNA, limítrofe e EHNA) e quando ≥ 5 correlacionou-se com a presença de EHNA (tabela 1) (KLEINER et al., 2005).

Tabela 1 – Parâmetros do sistema de escore para a análise histológica da DHGNA

Item	Definição	Escore
Grau de esteatose	<5%	0
	5 a 33%	1
	>33 a 66%	2
	>66%	3
Inflamação lobular	Sem foco	0
	<2 focos/ campo (200x)	1
	2-4 focos/campo (200x)	2
	>4 focos/campo(200x)	3
Balonização	Ausente	0
	Poucas células	1
	Muitas células	2
Estágio de fibrose	Ausente	0
	Perisinusoidal ou periportal	1
	Leve, zona 3, perisinusoidal	1A
	Moderada, zona 3, perisinusoidal	1B
	Portal/ periportal	1C
	Perisinusoidal e Portal/periportal	2
Pontes de fibrose	3	

	Cirrose	4
Escore de atividade da DHGNA	EHNA ausente	0-2
	Indeterminado	3-4
	EHNA presente	≥5

Fonte: (KLEINER et al., 2005)

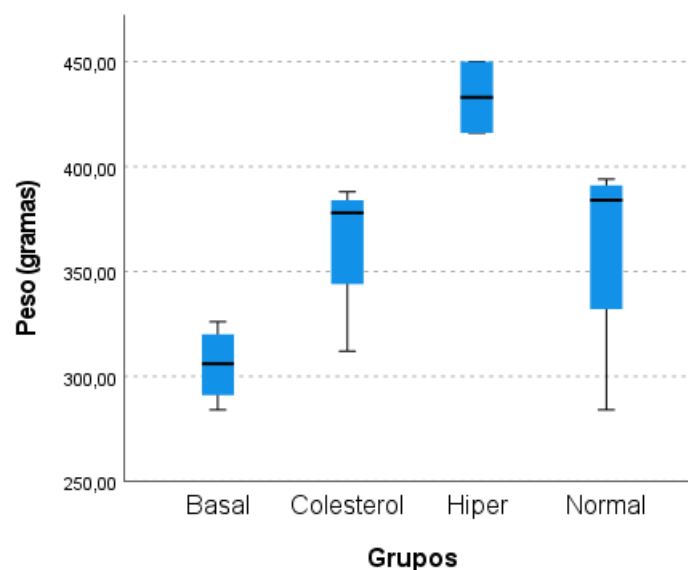
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (variáveis quantitativas). As comparações entre os grupos foram feitas usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. A condição de normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

4 RESULTADOS

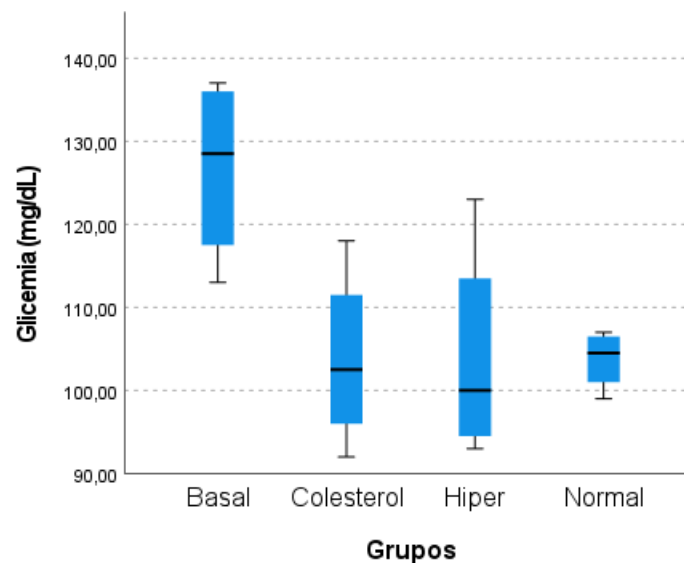
Na linha de base os pesos e a glicemia foram semelhantes em todos os grupos. Na eutanásia, o peso dos animais foi significativamente diferente sendo observada a maior média no grupo DH. A comparação entre os grupos dois a dois mostrou diferença significativa entre os grupos CB e DH, e colesterol e DH. Entretanto, após ajuste pela correção de Bonferroni, houve a manutenção da diferença estatística somente na comparação entre os grupos CB e DH, $p=0,009$, (Figura 1).

Figura 1 - Peso dos animais na eutanásia. Basal: grupo controle basal, Hiper: grupo dieta hiperlipídica, Normal: grupo controle normal.



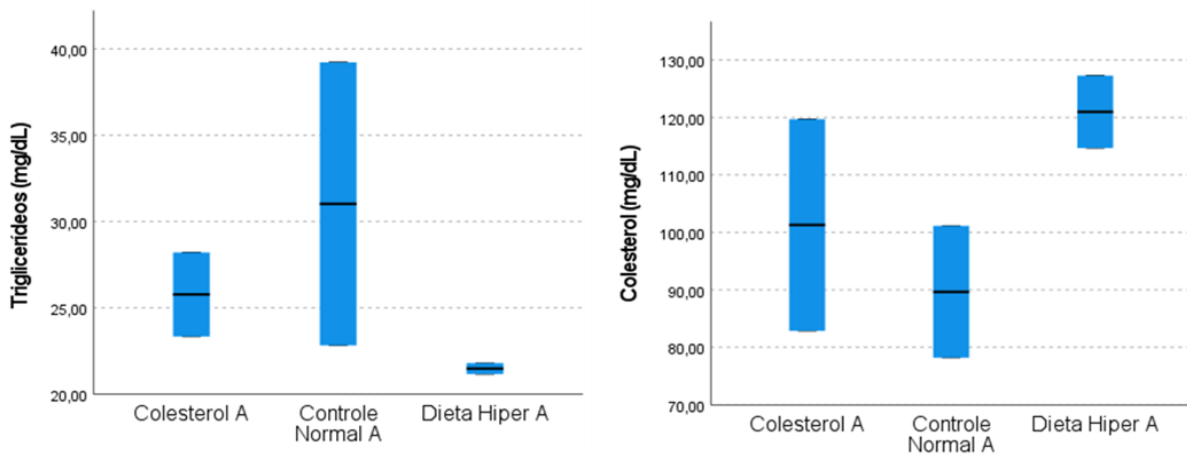
A glicemia na eutanásia foi significativamente diferente entre os grupos, sendo a maior média do grupo CB. A comparação entre os grupos dois a dois mostrou diferença significativa quando comparados os grupos colesterol e GN com o grupo CB. No entanto, após o ajuste pela correção de Bonferroni houve manutenção da significância estatística somente na comparação grupo CB e grupo colesterol, $p=0,036$ (figura 2).

Figura 2 – Glicemia capilar na eutanásia. Basal: grupo controle basal, Hiper: grupo dieta hiperlipídica, Normal: grupo controle normal.



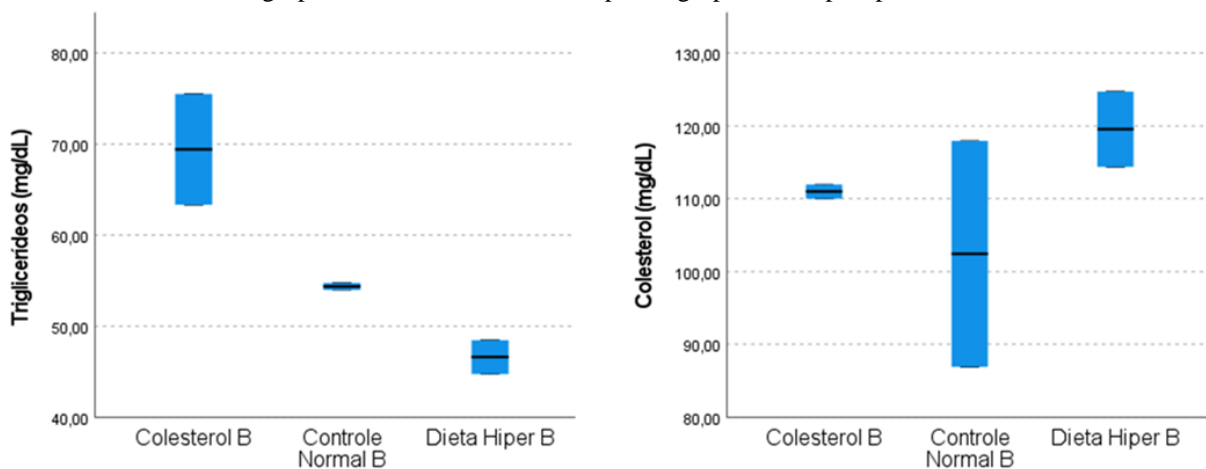
Os níveis séricos de triglicérides e colesterol foram avaliados nos grupos colesterol, GN e DH, na eutanásia 1 (8 semanas) e eutanásia 2 (12 semanas). Tanto os níveis de triglicérides como os níveis de colesterol foram semelhantes nas duas eutanásias. Na eutanásia 1, a maior e menor média de triglicérides foram observadas respectivamente nos grupos GN e DH, sendo a maior e menor média de colesterol total observadas de forma respectiva nos grupos DH e GN (figura 3).

Figura 3 – Níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total na eutanásia 1. Colesterol A: grupo colesterol, Controle Normal A: grupo controle normal, Dieta Hiper A: grupo dieta hiperlipídica.



Na eutanásia 2, observou-se níveis séricos mais elevados de triglicerídeos e colesterol total nos grupos colesterol e DH, sendo os níveis mais baixos das variáveis citadas observados nos grupos DH e GN (figura 4).

Figura 4 – Níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total na eutanásia 2. Colesterol B: grupo colesterol, Controle Normal B: grupo controle normal, Dieta Hiper B: grupo dieta hiperlipídica.



Os pesos hepáticos foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo a média de peso mais elevada no grupo DH. A comparação entre os grupos dois a dois, mostrou diferença significativa quando comparados os grupos CB e o grupo GN com o grupo DH. Todavia, para ambas as comparações, após ajustadas pela correção de Bonferroni houve perda da significância estatística. A relação peso hepático e peso do animal também teve diferença significativa entre os grupos, sendo a maior média observada no grupo DH. A comparação entre os grupos, 2 a 2, mostrou diferença significativa quando comparados os grupos colesterol e DH com o grupo CB. Porém,

após o ajuste pela correção de Bonferroni, houve perda da diferença estatística em ambas as comparações, sendo o valor de p limítrofe na comparação CB e DH, $p=0,055$ (tabela 2).

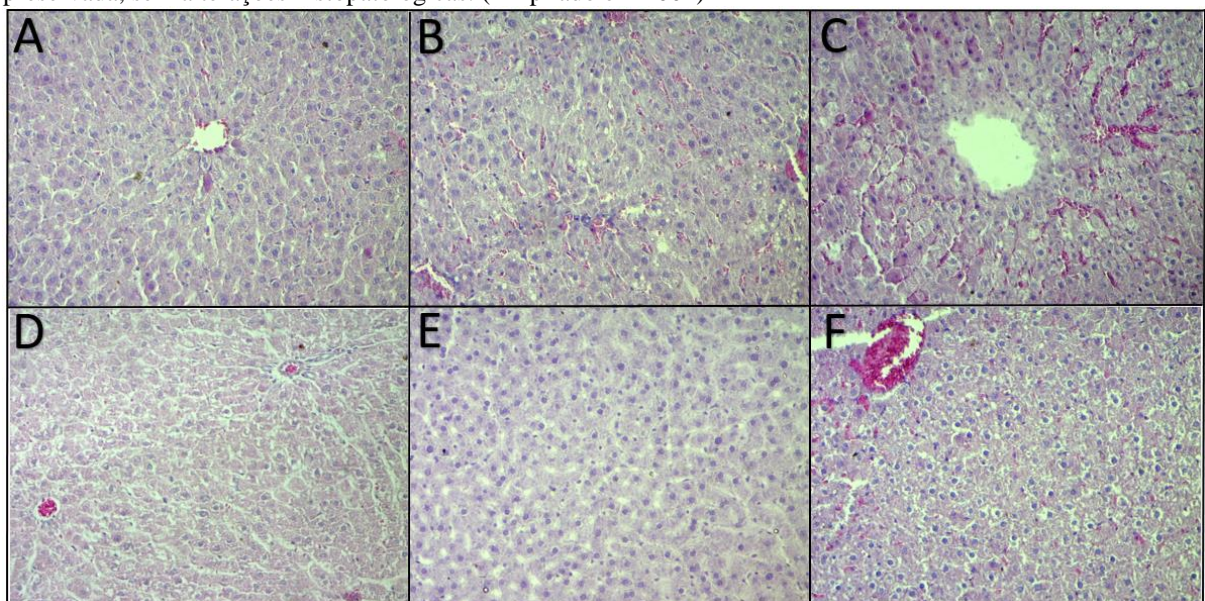
Tabela 2 - Médias das variáveis metabólicas e séricas na eutanásia 0, 1 e 2, peso em gramas e variáveis séricas em mg/dL.

	Eutanásia 0		Eutanásia 1		Eutanásia 2		
	Grupo CB	Grupo GN	Grupo colesterol	Grupo DH	Grupo GN	Grupo colesterol	Grupo DH
Peso animal	305,5	342,0	347,0	395,5	391,0	384,0	433,0
Peso hepático	8,888	9,854	11,054	12,731	13,662	15,00	15,811
Relação peso hepático/ peso animal	0,0290	0,0288	0,0318	0,0321	0,0349	0,0390	0,0365
Glicemia capilar	126,7	82,0	82,5	109,5	109,0	93,0	97,5
Colesterol	-	89,66	101,29	121,00	102,42	110,98	119,54
Triglicerídeos	-	31,02	25,76	21,47	54,35	69,42	46,60

Eutanásia 0: eutanásia na linha de base, Eutanásia 1: eutanásia na 8ª semana, Eutanásia 2: eutanásia na 12ª semana. Peso em gramas. Variáveis séricas em mg/dL.

A avaliação realizada sob os critérios do sistema de escore para a análise histológica da DHGNA não mostrou alterações que caracterizam o desenvolvimento da doença em nenhum animal utilizado nessa proposta de modelo experimental (figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografias, cortes de tecido hepático, coloração com HE na ampliação original, 200x. Eutanásia realizada na 8º semana (A,B,C) e eutanásia realizada na 12º semana (D,E,F). A e D: grupo controle normal, B e E: grupo colesterol, C e F: grupo dieta hiperlipídica. Fígados com arquitetura lobular preservada, sem alterações histopatológicas. (Ampliado em 200x)



5 DISCUSSÃO

A DHGNA encontra-se frequentemente associada a obesidade, DM2, DCV inclusive a hipertensão arterial sistêmica, e ao aumento de mortalidade principalmente por DCV. Portanto, iniciativas de caráter eminentemente preventivo como o dia mundial de hipertensão (VIECHINESKI et al., 2021) e o dia mundial do coração (DE OLIVEIRA et al., 2021) podem contribuir para a redução das complicações relacionadas a associação dessas doenças.

No experimento em questão observou-se maior ganho de peso no grupo DH quando comparado aos grupos CB e colesterol. Entretanto, após ajuste pela correção de Bonferroni, houve a manutenção da diferença estatística somente na comparação entre os grupos CB e DH, $p=0,009$, (Figura 1). Cabe ressaltar que o grupo CB foi submetido à eutanásia na linha de base, portanto, espera-se que tenha a menor média de peso. Quanto a glicemia, a média observada foi significativamente maior no grupo CB, comparado ao GC e ao GN, mas após o ajuste pela correção de Bonferroni, houve perda da significância estatística, exceto na comparação com o grupo colesterol, $p=0,036$ (figura 2). Os níveis lipídicos, tanto de colesterol como de triglicerídeos, foram semelhantes entre os grupos na eutanásia. Portanto, podemos inferir que o ganho de peso ocorrido no grupo DH não foi associado à hiperglicemia ou a hiperlipidemia.

Os pesos hepáticos, bem como a relação peso hepático e peso do animal tiveram comportamento semelhante, sendo observadas as maiores médias no grupo DH (tabela 2). Levando-se em conta que nenhum dos grupos desenvolveu anormalidades histológicas, esses resultados não podem ser relacionados de forma adequada com o desenvolvimento de DHGNA.

O modelo animal, incontestavelmente, tem contribuído de forma expressiva com o conhecimento científico, apesar das limitações naturais inerentes a cada modelo proposto. Contudo, no contexto da DHGNA e outras doenças humanas relacionadas a hábitos alimentares, aparentemente, os modelos animais adequados são aqueles que mimetizam essa condição, portanto, métodos caracteristicamente agressivos, como uso de substâncias tóxicas e composições dietéticas extremas devem ser evitados, sendo importante ressaltar que nenhum modelo animal desenvolverá doença com características idênticas à mesma doença em humanos. (SANTHEKADUR et al., 2018).

O modelo animal adequado para a DHGNA, em tese, seria aquele em que a doença fosse induzida por métodos naturais, relacionados aos hábitos alimentares atuais e que apresentasse as alterações histológicas básicas que caracterizam essa doença: esteatose,

inflamação lobular, degeneração balonizante de hepatócitos e algum grau de fibrose. Modelos utilizando ratos Wistar, que reportaram as alterações histológicas citadas, exceto a fibrose e utilizaram métodos de indução naturais, basicamente tiveram duração prolongada e ou foram aparentemente agressivos quanto à composição da dieta. Há relatos de dietas com 26,95% de gordura sem especificação, 39,5% de leite condensado e 17,5% de frutose com exposição de 20 semanas (WONG et al., 2020) dieta com 66,8% de sacarose com exposição de 18 semanas (OLIVEIRA et al., 2021) e outras com período curto de exposição, 4 semanas, mas com composição passível de questionamento como 60% de gordura saturada (WARDANI et al., 2020); ou 20% de óleo de soja oxidado e 20% de margarina (DHIBI et al., 2011) fontes potencialmente ricas de gordura trans cujo uso tende a ser restrito devido principalmente ao seu extremo potencial aterogênico.

No presente estudo, a dieta hiperlipídica utilizada no grupo DH, composta por 39.1% de carboidrato de baixa caloria, 16% de proteína e 46% de gordura não induziu DHGNA em 12 semanas. No entanto, possivelmente induziria algum grau de doença hepática se utilizada por mais algumas semanas. A ração colesterol a 3% também não induziu DHGNA utilizada no mesmo período, sugerindo uma possível resistência do rato Wistar a esses métodos de indução, seja pela composição e ou pelo tempo de exposição à dieta. Uma possível resistência à dieta hiperlipídica tem sido descrita, em ratos e camundongos, embora sem o entendimento adequado dos mecanismos envolvidos (WARDANI et al., 2020).

O coelho também tem sido utilizado como modelo animal de DHGNA e sob o ponto de vista histológico mostrou-se promissor quando submetido a dieta colesterol a 1% e 0,925%. Entretanto, coelhos são herbívoros e mesmo com baixo percentual de colesterol na dieta apresentaram níveis séricos de colesterol extremos em torno de 1000 e 2000 mg/dl (STURZENEKER, 2011; STURZENEKER et al., 2019). A ração padrão Nuvilar®, composta por 68% de carboidratos, 22,7% de proteínas e 9,3 % de gorduras, ajustada para o padrão hiperlipídico proposto para o grupo DH, acrescentando-se colesterol em percentual entre 2 e 3%, com período de exposição intermediário entre 12 e 20 semanas, possivelmente culminará com um modelo adequado de DHGNA em Wistar.

6 CONCLUSÕES

No modelo animal utilizado no presente estudo, a análise realizada sob os critérios do sistema de escore para a análise histológica da DHGNA não mostrou alterações que caracterizam o desenvolvimento da doença em nenhum dos grupos.

O período do estudo, 12 semanas, foi possivelmente insuficiente para indução de DHGNA em ratos Wistar por meio das composições dietéticas utilizadas.

Portanto, aparentemente dois ajustes básicos devem ser feitos: aumento do tempo de exposição, possivelmente 16 semanas e do potencial agressivo, porém de forma comedida, da composição da ração.

REFERÊNCIAS

- YOUNOSSI, Z. M. et al. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease- Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. **Hepatology**, v. 64, p. 73–84, 2016.
- GINSBERG, H. N.; ZHANG, Y.-L.; HERNANDEZ-ONO, A. Metabolic Syndrome: Focus on Dyslipidemia. **Obesity** [s.l: s.n.]. 2006.
- WILSON, P. W. F. et al. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 112, n. 20, p. 3066–3072, nov. 2005.
- HAMAGUCHI, M. et al. **The Metabolic Syndrome as a Predictor of Nonalcoholic Fatty Liver Disease**. 2005. Disponível em: <www.annals.org>.
- YOUNOSSI, Z. M. et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 6, 2011.
- HANLEY, A. J. G. et al. **Liver Markers and Development of the Metabolic Syndrome The Insulin Resistance Atherosclerosis Study**. [s.l: s.n.]. 2005.
- BYRNE, C. D.; TARGHER, G. **NAFLD: A multisystem disease** *Journal of Hepatology* Elsevier,, 2015.
- SZCZEPANIAK, L. S. et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, p. 462–468, 2005.
- CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328–357, 1 jan. 2018.
- VAN HERCK, M. A.; VONGHIA, L.; FRANQUE, S. M. **Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter’s guide** *Nutrients* MDPI AG, , 27 set. 2017.
- STEPHENSON, K. et al. Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. **Gene Expression**, v. 18, n. 1, p. 5–17, 3 nov. 2017.
- SANTHEKADUR, P. K.; KUMAR, D. P.; SANYAL, A. J. **Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease** *Journal of Hepatology* Elsevier B.V., , 1 fev. 2018.
- LIPINSKI, L. C. et al. Oral insulin improves metabolic parameters in high fat diet fed rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1699–1705, 1 jul. 2017.
- KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, jun. 2005.
- VIECHINESKI, F. N. et al. Dia Mundial de Hipertensão: 1ª edição / World Hypertension Day: 1st edition. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 11, p. 104993–104998, 15 nov. 2021.

DE OLIVEIRA, P. G. M. et al. Dia mundial do coração 1ª edição / World heart day 1st edition. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 118088–118094, 29 dez. 2021.

OLIVEIRA, D. T. et al. Liver lipidome signature and metabolic pathways in nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-sugar diet. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 87, 1 jan. 2021.

WONG, S. K. et al. Biochemical and histopathological assessment of liver in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate high-fat diet. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 10, 1 out. 2020.

WARDANI, H. A. et al. Development of nonalcoholic fatty liver disease model by high-fat diet in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 6, 1 nov. 2020.

DHIBI, M. et al. **The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.** [s.l: s.n.]. 2011.

STURZENEKER, M. C. S. et al. Olmesartan severely weakened the development of NASH in an animal model of hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 1, p. 97–102, maio 2011.

STURZENEKER, M.C.S. Original Article Ramipril significantly attenuates the development of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidaemic rabbits. **Am J Cardiovasc Dis.** [s.l: s.n.]. 2019. Disponível em: <www.AJCD.us>.