

**DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR DIETA RICA EM COLESTEROL**

 <https://doi.org/10.56238/sevened2025.021-007>

Maíza Pellissari Migliorini

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: maizamigliorini@gmail.com

Gabriel dos Santos

Graduando de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: 21041840@uepg.br

Maysa Ortolani Matera

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: 20205740@uepg.br

Karyn Maria Wenglarek

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: karynwenglarek@hotmail.com

Thais de Lima da Silva

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: 22280440@uepg.br

Jaqueline Meert Parlow

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: parlowjaqueline@hotmail.com

Isabela Hess Justus

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: isabelahessjustus@gmail.com

Flávia Cristina Colmenero

Graduanda de Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: flavcolmenero@gmail.com

Marcelo de Oliveira Dreweck

Mestrado em Cirurgia

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: modreweck@gmail.com



Sérgio Ossamu Ioshii

Doutor em Medicina

Instituição: Universidade Federal do Paraná

E-mail: sergio.ioshii@pucpr.br

Mário Cláudio Soares Sturzeneker

Doutor em Ciências da Saúde

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

E-mail: mcssturzeneker@gmail.com

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de doença hepática crônica em adultos. Encontra-se frequentemente associada à síndrome metabólica, obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (DCV), principalmente à DCV aterosclerótica que é estreitamente relacionada aos níveis de colesterol. O consumo de colesterol recomendado ao dia deve ser < 300 mg. Entretanto, a dieta contemporânea é marcada pelo elevado consumo de alimentos ricos em colesterol e gorduras saturadas. Nesse contexto, modelos animais com indução natural de doença, baseada em fatores de risco, mimetizando padrões alimentares contemporâneos, tem papel fundamental. Nessa linha, realizamos o presente experimento, utilizando 12 ratos Wistar divididos em 3 grupos: controle basal (GB), controle normal (GN) e colesterol (GC). O GB foi sacrificado na linha de base para obtenção de parâmetros basais normais. O GN recebeu dieta padrão e o GC recebeu uma dieta rica em colesterol, da linha de base ao final do estudo, quando foram coletadas amostras de sangue e de tecido hepático para confecção de lâminas, que foram analisadas de forma cega, sob os critérios do sistema de escore para avaliação histológica da DHGNA. Todos os animais do GC desenvolveram esteatose e balonização em seus maiores escores, A inflamação lobular moderada ocorreu em 75% e leve em 25% do grupo. Escores compatíveis com a presença de esteatohepatite não alcoólica (EHNA) foram observados em todo o GC. Conclui-se que houve o desenvolvimento de DHGNA experimental em rato Wistar e, com base no escore de atividade, houve o desenvolvimento de EHNA.

Palavras-chave: Hepatopatia Gordurosa não Alcoólica. Modelos Animais, Aterosclerose. Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica.

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é reconhecida globalmente como a causa mais comum de doença hepática crônica em adultos (Younossi et al., 2016), representando um problema de saúde crescente e frequentemente negligenciado (Mitra; De; Chowdhury, 2020). Encontra-se frequentemente associada a outras doenças prevalentes como obesidade, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2 (DM2), e tem sido descrita como uma manifestação hepática da síndrome metabólica (SM) (Younossi et al., 2019). Além disso, a DHGNA tem sido relacionada ao aumento de mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (Sheka et al., 2020).

A prevalência da DHGNA tem aumentado em paralelo à prevalência de obesidade, diabetes e a outros distúrbios metabólicos (Younossi et al., 2019). Com o crescente aumento da adoção de hábitos de vida sedentários e dietas ricas em gorduras saturadas, a DHGNA tem sido observada cada vez mais em populações jovens (Mitra; De; Chowdhury, 2020), o que é preocupante, pois sua progressão em crianças tende a ser mais rápida e agressiva em comparação à observada em adultos (Araújo et al., 2018). Em metanálise recentemente publicada, a prevalência mundial de DHGNA foi estimada em 30,1% (Younossi et al., 2023). No entanto, a prevalência global da doença está em ascensão, sendo estimado que até 2040, cerca de metade da população adulta será portadora de DHGNA (Le et al., 2022).

Quanto a histologia, a DHGNA pode ser dividida em fígado gorduroso não alcoólico (NAFL) e esteatohepatite não alcoólica (EHNA). O NAFL caracteriza-se pela presença de esteatose $\geq 5\%$ dos hepatócitos sem evidência de injúria hepatocelular evidenciada pela balonização. A EHNA é caracterizada pela presença de inflamação e balonização de hepatócitos com ou sem fibrose, além da presença de esteatose (Chalasanani et al., 2018). Recentemente, a DHGNA foi renomeada como doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (MASLD) e a EHNA como esteatohepatite associada à disfunção metabólica (MASH), sendo a nova definição caracterizada pela presença de pelo menos um fator de risco cardiometabólico, ausência de consumo ≥ 20 gramas/dia de álcool para mulheres ou ≥ 30 gramas/dia para homens e de outras causas de esteatose hepática. Conforme reportado por estudo que analisou banco de dados de DHGNA, 99,8% dos pacientes preencheram os critérios MASLD (Younossi et al., 2024).

A DHGNA é uma doença metabólica adquirida, induzida por estresse metabólico (Younossi et al., 2016). Sua fisiopatologia é complexa, multifatorial e envolve interações entre fatores ambientais, metabólicos, demográficos e genéticos (Caviglia et al., 2017), os quais estão diretamente associados ao estilo de vida ocidentalizado (Mitra; De; Chowdhury, 2020). A resistência insulínica (RI) é amplamente aceita como a causa básica do acúmulo lipídico nos hepatócitos (Savage; Petersen; Shulman, 2007), o que desencadeia o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica que, juntamente com a resposta inflamatória, culmina em lesão, morte celular e substituição fibrótica. Entretanto, em muitos

aspectos o complexo mecanismo fisiopatológico envolvido permanece sem a elucidação adequada (Sturzeneker; Précoma; Noronha, 2022; Sanyal, 2018).

Em 14 de março de 2024, o resmetirom (Rezdiffra) se tornou o primeiro medicamento aprovado pela U.S. Food And Drug Administration (FDA), órgão regulador dos Estados Unidos, para o tratamento de adultos com EHNA, não cirrótica com fibrose moderada a avançada, porém associado às mudanças do estilo de vida. Portanto, a terapêutica da DHGNA/MASLD em todo o seu espectro permanece um desafio. O resmetirom é um agonista seletivo do receptor beta do hormônio tireoidiano (THR- β) que, no fígado, estimula o metabolismo lipídico e previne lesões hepáticas induzidas pela lipotoxicidade. Sua liberação ocorreu após a publicação dos resultados do estudo: A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis (Harrison et al., 2024).

A DHGNA, associa-se de forma frequente, significativa e as vezes independente com as DCV, principalmente a doença aterosclerótica. Essa associação tem sido demonstrada de diferentes formas e tem reforçado a hipótese de que DHGNA seja, pelo menos, um marcador de risco para DCV. Essa forte relação, apesar de ter sido amplamente reportada, permanece não elucidada. A presença de fatores de risco para DCV comumente observada em portadores de DHGNA, dificulta o estabelecimento do real papel dessa doença no processo aterogênico. No entanto, características comuns relacionadas à fisiopatogenia de ambas, apontam para um número significativo de potenciais ligações entre elas (Francque; Van Der Graaff; Kwanten, 2016; Stahl et al., 2019). Nesse contexto, o colesterol, principalmente a fração low density lipoprotein (LDL) colesterol, é extremamente importante.

A dieta contemporânea é marcada pelo elevado consumo de alimentos de origem animal, importantes fontes de colesterol e gorduras saturadas, além de carboidratos refinados. Embora altos níveis de colesterol sejam comumente associados a nações ocidentais afluentes, os países asiáticos têm emergido como o novo epicentro global de dislipidemia quando analisado o colesterol não-HDL (Mitra; De; Chowdhury, 2020). Isso reflete a influência da globalização na adoção de dietas hipercalóricas, ricas em açúcares refinados e alimentos processados, além da redução da frequência de atividade física (Younossi et al., 2019). O consumo humano recomendado de colesterol alimentar é menor que 300 mg/dia (Mach et al., 2020). De acordo com o National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) de 2013 a 2014, nos Estados Unidos, 39% dos adultos com ≥ 20 anos de idade, sendo 46% homens e 28% mulheres, ingeriam > 300 mg/dia de colesterol (Xu; McClure; Appel, 2018). Em média, a carne (incluindo aves, pratos mistos, carne vermelha, carne processada) e frutos do mar contribuíram com 42% da ingestão total de colesterol, os ovos com 25% e outros grupos alimentares com o percentual restante (Carson et al., 2020).

Pesquisas utilizando modelos animais de DHGNA, particularmente roedores, têm sido cruciais para esclarecer os mecanismos e testar intervenções terapêuticas em ambientes controlados (Van Herck; Vonghia; Francque, 2017). Contudo, as metodologias empregadas variam consideravelmente,

refletindo a ausência de um modelo padrão. O modelo animal ideal para a DHGNA é, em tese, aquele em que a doença fosse induzida por métodos naturais, baseados em seus fatores de risco, mimetizando padrões alimentares contemporâneos e sendo capaz de apresentar todo o espectro histopatológico básico da condição: esteatose, inflamação lobular e degeneração balonizante de hepatócitos, com escores que caracterizem a esteatohepatite (Santhekadur; Kumar; Sanyal, 2018). Nesse sentido, realizamos o presente experimento com o objetivo de desenvolver um modelo animal de DHGNA que corresponda a tais expectativas.

2 OBJETIVO

Desenvolver um modelo animal de DHGNA, em ratos Wistar, utilizando uma dieta rica em colesterol para replicar, de forma aproximada, os hábitos alimentares sabidamente associados ao desenvolvimento da doença em seres humanos.

3 MÉTODO

3.1 AMOSTRA

Foram utilizados 12 ratos Wistar machos com 8 meses de idade, divididos em três grupos com quatro animais: grupo controle basal (GB), grupo controle normal (GN) e grupo colesterol (GC). O grupo GB foi sacrificado na linha de base para obtenção de parâmetros normais, basais de variáveis séricas, peso corporal e histologia hepática. O GN foi alimentado com ração padrão para ratos de laboratório, sem potencial para induzir distúrbios metabólicos e o GC recebeu a ração desenvolvida pela equipe de pesquisa, denominada ração colesterol. Ambos os grupos receberam seus respectivos alimentos e água *ad libitum* da linha de base à eutanásia, que ocorreu ao final da 16^a semana.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Ambiente de experimentação

Os animais foram transferidos do biotério para o laboratório de experimentação da UEPG, onde permaneceram por um período de adaptação de sete dias antes do início do experimento. Durante essa fase, tiveram livre acesso à ração padrão para ratos de laboratório e água. No macroambiente, foram respeitados os ciclos de iluminação de 12 horas, troca de ar contínua e temperatura controlada entre 19 e 23°C. No microambiente, os animais foram alojados em gaiolas de metal, higienizadas diariamente, com quatro animais por gaiola, identificados por uma marca de cor na cauda, definida para cada grupo, para facilitar o monitoramento individual. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética pertinente e seguiu as diretrizes estabelecidas, adotadas pelo Departamento de Medicina (DEMED) da UEPG para o manuseio de animais em experimentos.

3.2.2 Preparo da ração colesterol

Para o preparo da ração colesterol, utilizou-se 30 gramas de colesterol em pó, 130 gramas de açúcar refinado, 100 gramas de farinha de trigo refinada, 140 gramas de banha de porco, 600 gramas de ração padrão para ratos de laboratório e 300 gramas de água, sendo a composição aproximada em 100 gramas do alimento finalizado: sacarose 10 gramas, carboidratos 44,81 gramas, proteínas 10,7 gramas, colesterol 3,13 gramas, gorduras totais sem colesterol 14,9 gramas e água residual. Todos os ingredientes foram devidamente pesados em balança de precisão, misturados para obtenção de massa homogênea e assados em forno pré-aquecido por 15 minutos. Após o resfriamento, o produto foi cortado em tamanho apropriado para adaptação ao comedouro.

3.2.3 Retirada de amostras de sangue

Na eutanásia todos os animais, sob anestesia, foram submetidos a coleta de amostras de sangue após um período de jejum de 12 horas, a fim de analisar os níveis séricos de glicose, aminotransferases, colesterol total e triglicerídeos.

3.2.4 Ressecção e pesagem hepática

A ressecção hepática foi realizada em todos os ratos, sob anestesia, na eutanásia. Após o procedimento anestésico e tricotomia da região abdominal, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e submetidos à laparotomia mediana iniciada no processo xifoide, com exposição e remoção do fígado, seguida da eutanásia dos animais. Os fígados foram pesados e segmentos dos lobos de maior expressão anatômicas foram ressecados e fixados em formaldeído.

3.2.5 Análise histológica

As amostras de tecido hepático previamente fixadas em formaldeído e submetidas a inclusão em parafina, foram seccionadas para confecção de lâminas que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica. As lâminas foram analisadas de forma cega, utilizando os principais parâmetros do sistema de escore de escore para análise histológica da DHGNA (Tabela 1). O escore de atividade da DHGNA (EAD), componente desse sistema de escore, corresponde à soma não ponderada dos escores de esteatose, balonização e inflamação lobular. Em estudo de validação, o $EAD \leq 2$ foi fortemente relacionado à ausência de EHNA, escores entre 3 e 4 não tiveram valor discriminativo, ficando distribuídos de forma semelhante entre os 3 diagnósticos (ausência de EHNA, limítrofe ou EHNA); e escores ≥ 5 foram relacionados significativamente com a presença de EHNA (Kleiner *et al.*, 2005).

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

Alteração histológica	Definição	Escore
	<5%	0
Grau de esteatose	5 a 33%	1
	>33 a 66%	2
	>66%	3
	Sem foco	0
Inflamação lobular	<2 focos/campo (200x)	1
	2-4 focos/campo (200x)	2
	>4 focos/campo (200x)	3
	Ausente	0
Balonização	Poucas células	1
	Muitas células	2
	Ausente	0
	Perisinusoidal ou periportal	1
Estágio de fibrose	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 de DHGNA	EHNA ausente	0-2
	Indeterminado	3-4
	EHNA presente	≥5

Fonte: composição dos autores

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos por médias, desvios padrões ou por frequências e percentagens. A distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade pelo teste de Levene. Os grupos foram comparados, quanto às variáveis quantitativas com distribuição normal, utilizando-se o modelo de análise de variância (ANOVA) a um fator (Fisher), sendo a comparação 2 a 2 realizada por meio do teste post-hoc de Tukey. Em relação às variáveis quantitativas sem distribuição normal, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o modelo de análise de variância (ANOVA) a um fator não-paramétrica (Kruskal-Wallis), sendo a comparação 2 a 2 realizada através do teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Jamovi, versão 2.3, sendo considerados significativos, valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao peso dos animais, do fígado e a relação peso do fígado/peso do animal entre os grupos, tanto na linha de base, quanto na eutanásia (tabela 2).

Tabela 2 – Médias de pesos em gramas, na linha de base e eutanásia.

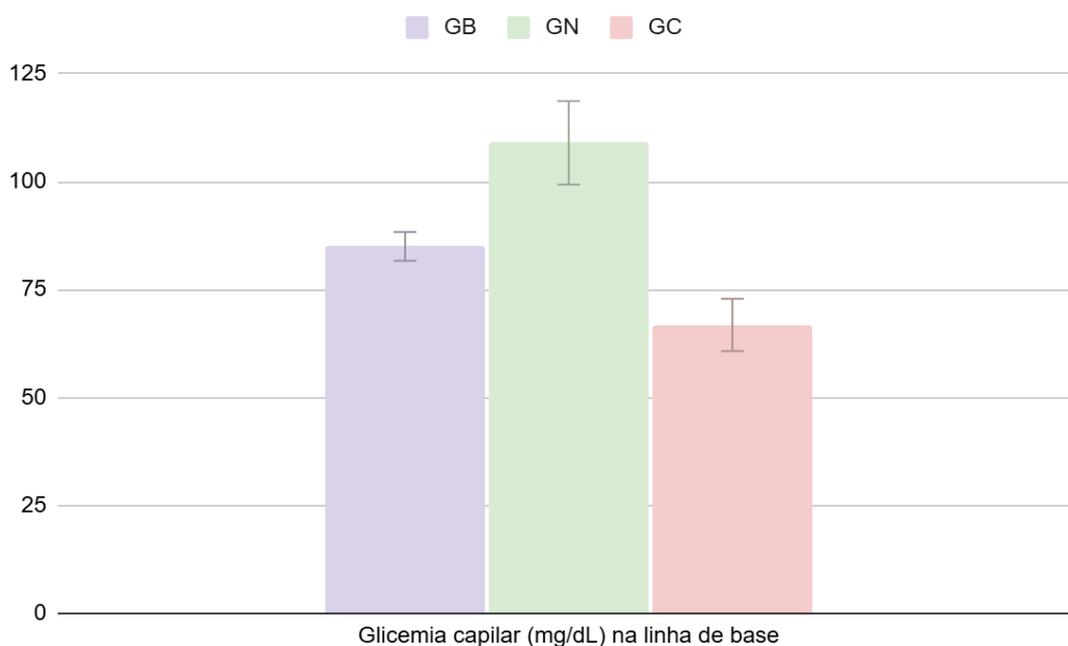
	Linha de base			Eutanásia		
	GN	GB	GC	GN	GB	GC
Peso animal	502	456	428	540	-	471
Peso hepático	-	16.3	-	17.5	-	17.3
Relação peso fígado/animal	-	0.036 0	-	0.0326	-	0.0362

GN: grupo controle normal; GB: grupo controle basal; GC: grupo colesterol.

Fonte: composição dos autores.

Os níveis de glicemia capilar foram significativamente diferentes entre os grupos na linha de base ($p < 0,001$), sendo a maior e a menor média observada, respectivamente, no GN e GC (figura 1). Os testes *post-hoc* mostraram aumento significativo no GN comparado ao GB ($p = 0,004$) e ao GC ($p < 0,001$), e de forma semelhante no GC comparado ao GB ($P = 0,02$). Ao final do estudo, entre a 15 e 16ª semana, os níveis de glicemia capilar também foram diferentes entre os grupos ($p = 0,025$). A maior e a menor média ocorreram novamente no GN e GC, porém os testes *post-hoc* mostraram diferença significativa somente entre o GN e o GC ($p = 0,022$).

Figura 1- Glicemia capilar na linha de base.

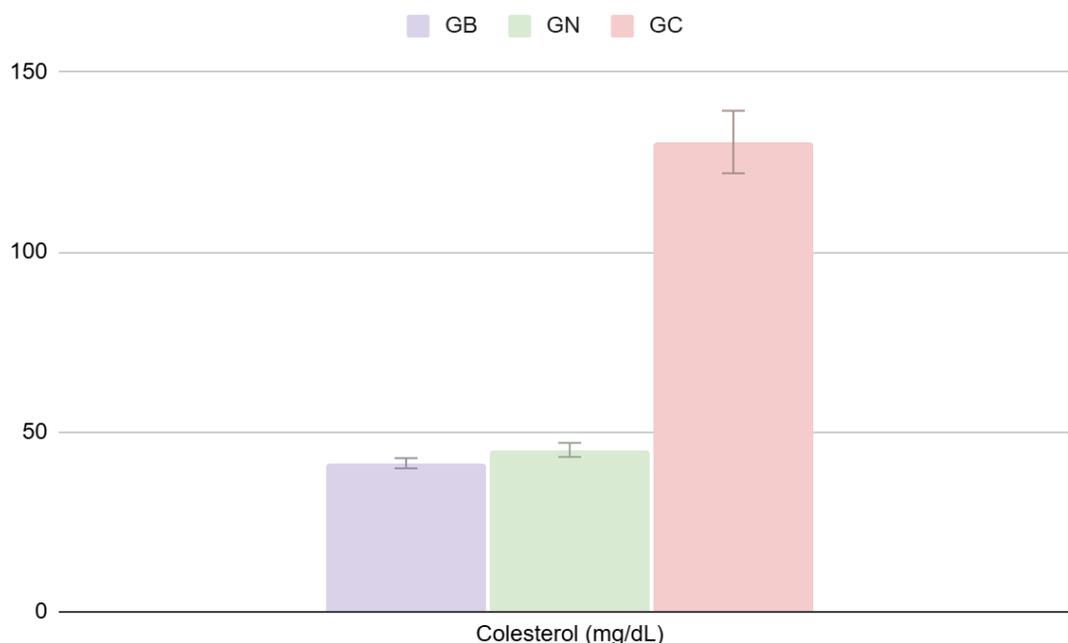


Legenda: GB: grupo controle basal, GN: grupo controle normal, GC: grupo colesterol.

Houve diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis séricos de colesterol total ($p < 0,001$), sendo esses níveis significativamente mais elevados no GC comparado aos grupos controle: GB e GN. A média de colesterol sérico no GC foi de 130,6 mg/dL, em contraste com 41,3 mg/dL no GB e 45,3 mg/dL no GN (figura 2). A comparação 2 a 2 mostrou diferença significativa entre o GC e

os grupos controle, com valor de $p < 0,001$ para ambas as comparações. No entanto, os níveis séricos de triglicérides foram semelhantes entre os 3 grupos ($p = 0,650$). Em relação aos níveis séricos de aminotransferases, não se observou diferença significativa entre os 3 grupos quanto aos níveis de AST ($p=0,406$) ou ALT ($p=0,982$).

Figura 2: Níveis séricos de colesterol total.



Legenda: GB: grupo controle basal, GN: grupo controle normal; GC: grupo colesterol.

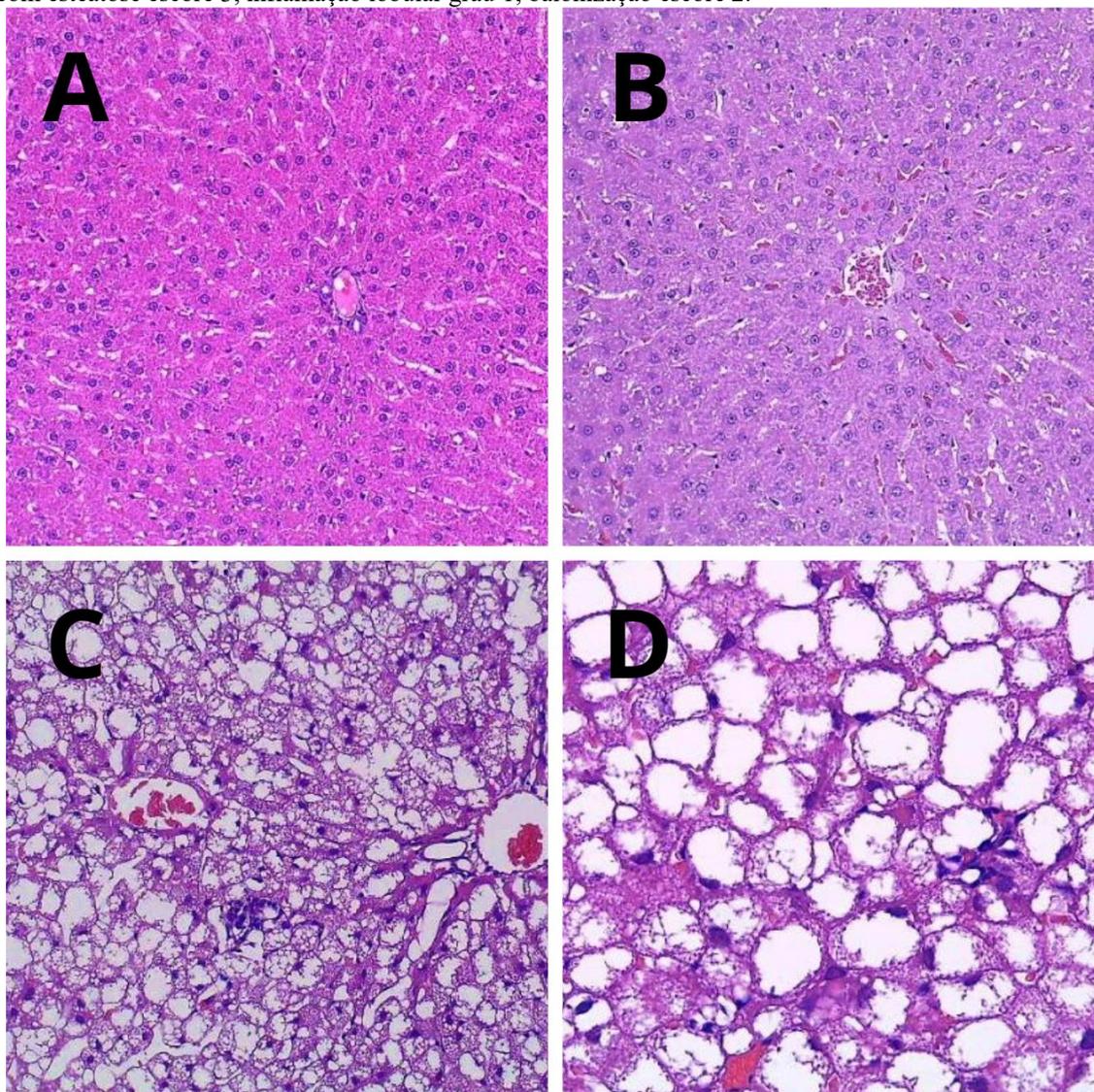
A respeito da análise histológica, todos os animais do GC desenvolveram esteatose severa, em seu maior escore (escore 3), sendo esse parâmetro histológico normal (escore 0) nos grupos controle: GB e GN (tabela 3, figura 3). Quanto à inflamação lobular, somente um animal do GC (25%) apresentou inflamação leve (escore 1), o restante do grupo (75%) desenvolveu inflamação lobular moderada (escore 2). De forma semelhante à esteatose, a inflamação lobular não ocorreu nos grupos controle (tabela 3, figura 3).

Em relação à balonização de hepatócitos, todos os ratos do GC desenvolveram essa alteração em seu maior grau (escore 2). Similarmente à esteatose e à inflamação lobular, a balonização não ocorreu nos grupos controle (tabela 3, figura 3). A fibrose não foi observada no GC, e da mesma forma que as outras alterações histológicas anteriormente citadas, não ocorreu nos grupos controle. Quanto ao escore de atividade da DHGNA, utilizado para estimar a presença de EHNA, todos os animais do GC apresentaram escores ≥ 5 , compatíveis com a presença de EHNA (tabela 3).

Tabela 3 – Análise histológica dos ratos do grupo colesterol (GC).

Alteração histológica	Definição	Escore	Grupo			
			GC1	GC2	GC3	GC4
Grau de esteatose	<5%	0				
	5 a 33%	1				
	>33 a 66%	2				
	>66%	3	X	X	X	X
Inflamação lobular	Sem foco	0				
	<2 focos/campo (200x)	1		X		
	2-4 focos/campo (200x)	2	X		X	X
	>4 focos/campo (200x)	3				
Balonização	Ausente	0				
	Poucas células	1				
	Muitas células	2	X	X	X	X
Estágio de fibrose	Ausente	0	X	X	X	X
Escore de atividade de DHGNA	EHNA ausente	0-2				
	Indeterminado	3-4				
	EHNA presente	≥5	X	X	X	X

Figura 3: Fotomicrografias de lâminas coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 200 X. (A) Rato do GB com arquitetura lobular hepática preservada, sem anormalidades. (B) Rato do GN com arquitetura lobular hepática preservada, sem anormalidades. (C) Rato do GC com esteatose escore 3, inflamação lobular escore 2, balonização escore 2. (D) Rato do GC com esteatose escore 3, inflamação lobular grau 1, balonização escore 2.



Legenda - GB: grupo controle basal, GN: grupo controle normal, GC: grupo colesterol.

Fonte: composição dos autores.

5 DISCUSSÃO

A DHGNA permaneceu sem tratamento farmacológico específico por mais de 40 anos. Em março de 2024 o FDA aprovou o uso do resmetirom para pacientes com EHNA, com características histológicas bem definidas por meio de biópsia hepática. Assim sendo, a terapêutica farmacológica da DHGNA, está definida para um perfil específico de apresentação da doença. Levando-se em conta o amplo espectro histológico, a complexidade da fisiopatogenia, bem como a associação com outras doenças prevalentes como as DCV, essa importante doença hepática crônica, cuja prevalência global está em ascensão, em muitos aspectos permanece não elucidada. Por conseguinte, são necessárias pesquisas tanto básicas como clínicas, e, nesse cenário, as pesquisas em modelos animais têm papel fundamental.

No presente estudo, o peso corporal, hepático e a relação peso hepático/peso corporal foram semelhantes entre os grupos, tanto na linha de base como na eutanásia. Portanto, o método de indução utilizado nesse modelo não causa ganho de peso corporal ou hepático significativo (tabela 2). Em relação ao peso corporal, achados semelhantes foram observados em estudo que utilizou camundongos machos da linhagem C57BL/6J submetidos a uma dieta rica em colesterol por 30 semanas (Savard et al., 2013). Achados também semelhantes foram reportados em revisão que avaliou modelos animais de DHGNA que utilizaram dietas enriquecidas com colesterol (Santhekadur; Kumar; Sanyal, 2018). No entanto, diferenças significativas entre os modelos, como a fonte de colesterol, o animal utilizado, bem como o tempo do estudo dificultam uma comparação adequada.

A respeito do peso hepático, em revisão que abordou métodos de indução de DHGNA, foi reportado que dietas ricas em colesterol isolado não aumentam o peso hepático (Flessa et al., 2022). Resultados discordantes foram relatados em estudo que avaliou os efeitos de uma dieta com 1,5% de colesterol em camundongos transgênicos HCVcpTg por 15 meses (Wong et al., 2020), em estudo que utilizou ratos Fisher submetidos à dieta deficiente em colina (Kaji et al., 2011) e em estudo que utilizou ratos Wistar submetidos à dieta deficiente em colina e metionina (Hirose et al., 2007). Entretanto, a comparação com os resultados do presente estudo torna-se limitada, particularmente pela diferença entre os métodos de indução.

A presença de níveis significativamente mais baixos de glicemia capilar no GC comparado ao GN e GB na linha de base e comparado ao GC na fase final do estudo sugerem que não houve influência da dieta utilizada em nosso estudo nos níveis de glicemia capilar. Achados similares foram descritos em estudo mencionado anteriormente (Savard et al., 2013), embora a comparação seja limitada pelos fatores citados previamente.

O aumento significativo dos níveis de colesterol sérico observado no GC, comparado aos grupos controle, corrobora a associação entre a dieta utilizada e os níveis séricos de colesterol. Com as limitações previamente referidas, Savard et al. (2013) relatou resultados semelhantes. Em um estudo prévio realizado em nossa instituição, Mota et al. (2022) adotando método observou resultado divergente, provavelmente porque os ratos eram mais jovens e pelo menor tempo de exposição à dieta indutora de doença (10 semanas). A respeito dos níveis séricos de triglicérides, em nosso estudo, não se observou diferença significativa entre os grupos, resultado diferente dos reportados em dois estudos que utilizaram dieta deficiente em colina (Kurita et al., 2008; Kaji et al., 2011). Contudo, além da diferença entre os métodos de indução, a dieta deficiente em colina pode ter influenciado esses resultados.

Os níveis séricos de AST e ALT foram semelhantes entre os grupos, contrastando com a elevação significativa de ambas as aminotransferases descrita em estudo que submeteu ratos Wistar à dieta deficiente em colina e metionina (MCD), (Hirose et al., 2007). Todavia, a diferença entre os

métodos de indução impossibilita uma comparação razoável. Adicionalmente, apenas uma pequena percentagem de indivíduos com esteatose sem causa identificável (2,8 a 5,4%) apresenta elevação dos níveis séricos de aminotransferases (Szczeponiak et al., 2005).

No que tange à análise histológica, todos os animais do GC desenvolveram esteatose intensa, em seu maior escore (escore 3), sendo esse parâmetro histológico normal (escore 0) nos grupos controle: GB e GN (tabela 3, figura 3). Quanto à inflamação lobular, somente um animal do GC (25%) apresentou inflamação leve ou tênue (escore 1), o restante do grupo (75%) desenvolveu inflamação lobular moderada (escore 2). Assim como a esteatose, a inflamação lobular não foi observada nos grupos controle (tabela 3, figura 3).

Em relação à balonização de hepatócitos, todos os ratos do GC desenvolveram tal alteração histológica em seu maior grau (escore 2). De forma semelhante à esteatose e à inflamação lobular, a balonização não foi observada nos grupos controle (tabela 3, figura 3). A fibrose, foi a única alteração histológica básica não observada no GC, e, da mesma forma que as outras alterações histológicas anteriormente citadas, não ocorreu nos grupos controle. No que concerne ao escore de atividade da DHGNA, utilizado para estimar a presença de EHNA, todos os animais do GC apresentaram escores ≥ 5 , compatíveis com a presença de EHNA (tabela 3).

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram reportados por Savard et al. (2013), que observaram o desenvolvimento de esteatose hepática leve a moderada, infiltrado inflamatório leve e ausência de fibrose. No entanto, o animal, a fonte de colesterol e o tempo de exposição à dieta foram diferentes, o que limita comparação dos resultados. Em relação à inflamação lobular, Kurita et al. (2008) descreveram inflamação lobular “intensa”, em ratos Otsuka Long-Evans Tokushima (OLETF), submetidos à dieta MCD por 8 semanas. Resultado que difere do encontrado em nosso experimento quanto a intensidade da inflamação lobular desenvolvida. Entretanto, o rato OLEFT é uma linhagem selecionada por desenvolver espontaneamente hiperglicemia e obesidade, fatores adicionais para o desenvolvimento de injúria hepática.

A respeito da balonização, assim como no presente experimento, Hirose et al. (2007) relataram balonização acentuada em ratos Wistar alimentados com dieta MCD por 15 semanas. A diferença extrema entre os métodos de indução torna a comparação comprometida, apesar da semelhança entre os resultados. Quanto à substituição fibrótica, consequência da lesão e morte dos hepatócitos, Kaji et al. (2011) observaram o desenvolvimento de fibrose em ratos Fisher submetidos à dieta deficiente em colina por 12 semanas, Wong et al. (2020) em camundongos transgênicos submetidos a uma dieta rica em colesterol por 15 meses e Hirose et al. (2007) em ratos Wistar alimentados com dieta MCD por 15 semanas. Em contraste com esses resultados, no presente estudo não houve o desenvolvimento de fibrose. Todavia, excetuando o estudo de Hirose et al. (2007), os outros estudos citados utilizaram animais diferentes e todos eles utilizaram métodos de indução aparentemente mais agressivos do que

aquele utilizado e nosso experimento. Além disso, Wong et al. (2020) utilizaram camundongos transgênicos e o período de estudo foi mais de 3 vezes maior do que o adotado no presente estudo.

A A EHNA é caracterizada pela presença de esteatose $\geq 5\%$ dos hepatócitos, inflamação lobular e balonização de hepatócitos com ou sem fibrose. Portanto, o modelo proposto apresentou os critérios compatíveis com a presença de EHNA. Da mesma forma, a presença de pelo menos um fator de risco, e, nesse caso em comparação com os grupos controle, pode-se inferir que houve hipercolesterolemia no GC, caracteriza a presença de MASH. Assim sendo, houve o desenvolvimento de um modelo animal em rato Wistar de DHGNA/MASLD e de EHNA/MASH, utilizando como indutora uma dieta compatível com os hábitos alimentares humanos atuais. Ressaltamos como limitações o n amostral reduzido e o óbito de um dos ratos do GC duas semanas antes da eutanásia, o que impediu que fossem coletadas amostra de sangue desse animal. No entanto, as alterações histológicas foram idênticas às apresentadas pelos demais ratos do grupo, exceto a inflamação lobular que foi em menor escore em um deles (tabela 3).

6 CONCLUSÃO

No modelo proposto, houve o desenvolvimento de DHGNA/MASLD em ratos Wistar, utilizando uma dieta que, de forma aproximada, mimetiza os hábitos alimentares humanos atuais, sabidamente associados ao desenvolvimento da doença cardiometabólicas. Com base no escore de atividade da DHGNA, houve o desenvolvimento de esteatohepatite não alcoólica/esteatohepatite associada à disfunção metabólica.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. R. et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver International*, v. 38, n. S1, p. 47–51, 2018.
- CARSON, J. A. S. et al. Dietary Cholesterol and Cardiovascular Risk: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, v. 141, n. 3, 2020.
- CAVIGLIA, G. P. et al. Liver fibrosis: the 2017 state of art. *Panminerva Medica*, v. 59, n. 4, 2017.
- 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, 2018.
- FLESSA, C.-M. et al. Genetic and Diet-Induced Animal Models for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Research. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 24, p. 15791, 2022.
- FRANCQUE, S. M.; VAN DER GRAAFF, D.; KWANTEN, W. J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *Journal of Hepatology*, v. 65, n. 2, p. 425–443, 2016.
- HARRISON, S. A. et al. A Phase 3, Randomized, Controlled Trial of Resmetirom in NASH with Liver Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, v. 390, n. 6, p. 497–509, 2024.
- HIROSE, A. et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, v. 45, n. 6, p. 1375–1381, 2007.
- KAJI, K. et al. Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 300, n. 6, p. G1094–G1104, 2011.
- 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, 2005.
- KURITA, S. et al. Olmesartan ameliorates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis through its pleiotropic effects. *European Journal of Pharmacology*, v. 588, n. 2–3, p. 316–324, 2008.
- LE, M. H. et al. Forecasted 2040 global prevalence of nonalcoholic fatty liver disease using hierarchical bayesian approach. *Clinical and Molecular Hepatology*, v. 28, n. 4, p. 841–850, 2022.
- MACH, F. et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, v. 41, n. 1, p. 111–188, 2020.
- MITRA, S.; DE, A.; CHOWDHURY, A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, v. 5, p. 16–16, 2020.
- MOTA, J. A. S. et al. 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. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 4, p. 28639–28653, 2022.
- SANTHEKADUR, P. K.; KUMAR, D. P.; SANYAL, A. J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 68, n. 2, p. 230–237, 2018.



SANYAL, A. J. Putting non-alcoholic fatty liver disease on the radar for primary care physicians: how well are we doing?. *BMC Medicine*, v. 16, n. 1, p. 148, 2018.

SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 2, p. 507–520, 2007.

SAVARD, C. et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis. *Hepatology*, v. 57, n. 1, p. 81–92, 2013.

SHEKA, A. C. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*, v. 323, n. 12, p. 1175, 2020.

STAHL, E. P. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Heart. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 73, n. 8, p. 948–963, 2019.

STURZENEKER, M. C. S.; PRÉCOMA, D. B.; NORONHA, L. D. Doença hepática gordurosa não alcoólica: evidências, tendências e perspectivas. In: *Procardiol: Programa de Atualização em Cardiologia: Ciclo 16: Volume 3. Artmed panamericana*, 2022;3(16):47-72.

SZCZEPANIAK, L. S. et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 288, n. 2, p. E462–E468, 2005.

VAN HERCK, M.; VONGHIA, L.; FRANQUE, S. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—A Starter’s Guide. *Nutrients*, v. 9, n. 10, p. 1072, 2017.

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, 2020.

XU, Z.; MCCLURE, S.; APPEL, L. Dietary Cholesterol Intake and Sources among U.S Adults: Results from National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), 2001–2014. *Nutrients*, v. 10, n. 6, p. 771, 2018.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.

YOUNOSSI, Z. et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, v. 69, n. 6, p. 2672–2682, 2019.

YOUNOSSI, Z. M. et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*, v. 77, n. 4, p. 1335–1347, 2023.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Clinical profiles and mortality rates are similar for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 80, n. 5, p. 694–701, 2024.