



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

André Almo de Moraes Coutinho

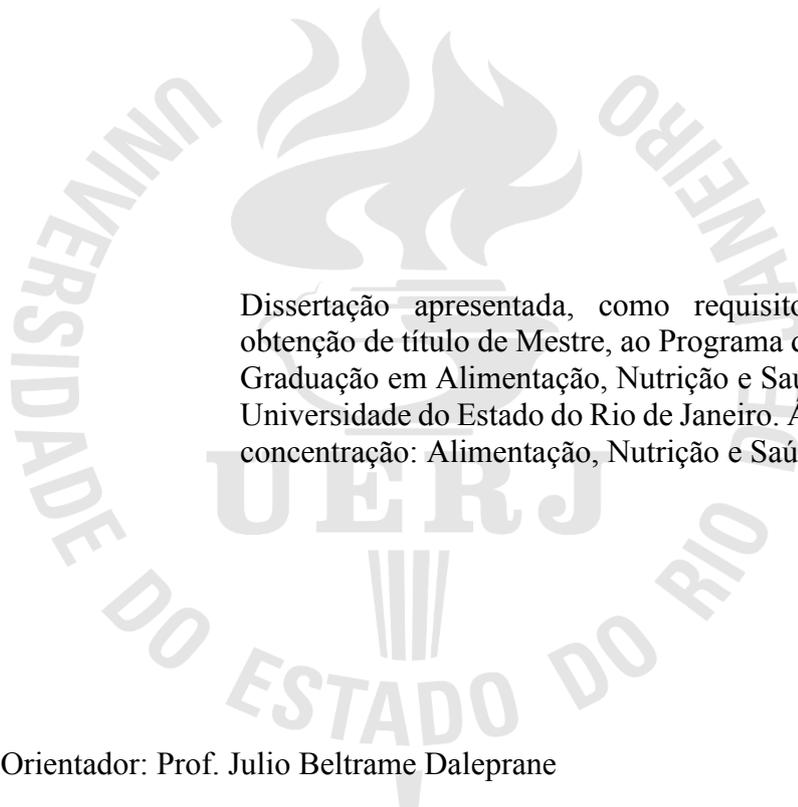
**Gorduras *trans* e interesterificadas no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em ensaios pré-clínicos com roedores: uma revisão sistemática**

Rio de Janeiro

2021

André Almo de Moraes Coutinho

**Gorduras trans e interesterificadas no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica em ensaios pré-clínicos com roedores: uma revisão sistemática**



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientador: Prof. Julio Beltrame Daleprane

Coorientadora: Dra. Fernanda Torres Quitete

Rio de Janeiro  
2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

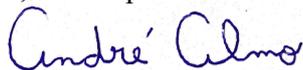
C871 Coutinho, André Almo de Moraes.  
Gorduras trans e interesterificadas no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em ensaios pré-clínicos com roedores: uma revisão sistemática / André Almo Coutinho de Moraes Coutinho. – 2021.  
82 f.

Orientador: Julio Beltrame Daleprane.  
Coorientador: Fernanda Torres Quiete  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Nutrição

1. Doença hepática – Teses. 2. Gordura trans – Teses. 3. Revisão sistemática – Teses. I. Daleprane, Julio Beltrame. II. Quiete, Fernanda Torres. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. III. Título.

bs CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

05/10/2021

Data

André Almo de Moraes Coutinho

**Gorduras trans e interesterificadas no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica em ensaios pré-clínicos com roedores: uma revisão sistemática**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção de título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada em 30 de agosto de 2021

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane (Orientador)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro



---

Prof.ª Dr.ª Cintia Chaves Curioni

Universidade do Estado do Rio de Janeiro



---

Prof.ª Dr.ª Marciane Miñanski Ferreira

Universidade Estadual de Campinas

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pedras e desvios que encontrei em meu caminho.

A todas as pessoas de minha vida que, de alguma forma, me ajudaram acadêmica ou emocionalmente a desenvolver e finalizar este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Dois anos passam mais rápido do que podemos imaginar; talvez passem especialmente rápido quando se está dentro de casa com um vírus respiratório potencialmente letal do lado de fora. Os dias à frente do computador pareciam se repetir, mesmo que tudo à minha volta estivesse mudando. Apesar do cenário surreal que vivemos – permeado por terror e incerteza – me sinto grato por ter sobrevivido e, de mais formas do que consigo enumerar, aprendido.

Agradeço a todos os professores e colegas do Instituto de Nutrição da UERJ. Apesar de curto, tenho a certeza de que meu tempo nesta universidade foi de grande valia. Aprofundi meus conhecimentos em nutrição e aprendi mais técnicas do que imaginava que aprenderia: de bater em células presas numa garrafa a sobreviver a mordidas de camundongos filhotes. Um obrigado especial a Julio e Fernanda, que conseguiram não só suportar minhas piadas e trocadilhos – esses eu tenho certeza que o Julio gostou – mas também por aguentar os áudios e reflexões acadêmicas durante as madrugadas desta época pandêmica.

Agradeço, também, à Martina, pelo apoio prestado durante todas as etapas da revisão, mesmo lidando com grandes mudanças e tarefas em sua vida. Esse trabalho não teria sido possível sem você!

A meus pais – e até à minha irmã, que cito relutantemente – por terem convivido trancados comigo por mais ou menos um ano. Sei que pode não ser fácil lidar com empolgação, ansiedade e noites viradas.

A meus amigos – os poucos que sobraram após os furos de quarentena e tudo mais – por terem aguentado de tudo: memes, montagens, áudios e outras firulas que adoro fazer. Vocês deram a sorte – ou azar – de ter sido tudo virtual nestes quase dois anos.

Estes tempos me ensinaram muito, ainda que com muitas curvas e viradas de enredo inimagináveis. Aprendi sobre vida, morte, ansiedade, rotina, produtividade, amizade, amor e, claro, revisão sistemática. Foi uma montanha russa cheia de incertezas, mas não a trocaria por nada. Obrigado a todos que foram parte disso. Espero que acompanhem minhas façanhas e ideias mirabolantes por mais algum tempo.

Never underestimate the ability of the human animal to adapt to its environment.

*Misato Katsuragi*

## RESUMO

COUTINHO, A. A. M. *Gorduras trans e interesterificadas no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica em ensaios pré-clínicos com roedores: uma revisão sistemática*. 82f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado, que pode comprometer a função deste órgão e progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Essa condição afeta cerca de 25% da população adulta e sua prevalência crescente constitui um grande problema de saúde pública. Evidências reforçam a ideia de que a dieta tem um papel central na patogênese da DHGNA. Não apenas a quantidade ingerida, mas também o tipo de gordura dietética – incluindo lipídios quimicamente modificados, como as gorduras interesterificadas e *trans* – podem influenciar o desenvolvimento da doença. Modelos de roedores têm sido amplamente utilizados para se entender a patogênese da DHGNA e mimetizar a doença humana em ensaios pré-clínicos. No entanto, a heterogeneidade das dietas, a pouca atenção direcionada à fonte dos componentes dietéticos e uma falta de padronização podem comprometer a acurácia e interpretação dos achados dos estudos, questionando até mesmo a teoria de que o consumo de lipídios quimicamente modificados está ligado a efeitos deletérios. Assim, avaliamos sistematicamente a literatura pré-clínica examinando a composição das dietas usadas em ensaios com lipídios quimicamente modificados e modelos roedores de DHGNA, e os efeitos dessas intervenções dietéticas. A busca foi conduzida no banco de dados eletrônico *MEDLINE* em dezembro de 2020. Apenas artigos publicados em inglês após 1993 foram incluídos. Dados foram extraídos de gráficos e tabelas dos estudos incluídos com o uso de um *software* de digitalização. No total, 2132 artigos foram recuperados; 1042 artigos foram excluídos na primeira fase de seleção, e 1086 na segunda. Um total de 6 estudos foram incluídos na análise. A ausência de intervenções enriquecidas em gordura ou com gorduras quimicamente modificadas, o uso de modelos transgênicos, estudos *in vitro*, indução química/farmacológica da DHGNA e informações insuficientes sobre a dieta foram critérios de exclusão frequentes. As diferenças mais pronunciadas foram em relação à composição das dietas e ao período de intervenção. Apesar de haver muitos estudos sobre efeitos de dietas hiperlipídicas sobre a esteatose, existe uma lacuna no conhecimento de como a inclusão de gorduras quimicamente modificadas pode influenciar no desenvolvimento de DHGNA, devido a diversas variáveis de confusão. Os achados dos trabalhos pré-clínicos são insuficientes, e a heterogeneidade dos experimentos impede a sumarização das evidências e pode reduzir a validade dos dados em avaliar os efeitos da ingestão de gordura quimicamente modificada no início e na progressão da DHGNA.

**Palavras chave:** Doença hepática gordurosa não alcoólica. Gordura interesterificada. Gordura *trans*. Gordura quimicamente modificada. Revisão sistemática.

## ABSTRACT

COUTINHO, A. A. M. *Trans and interesterified fats in the development of non-alcoholic fatty liver disease in preclinical assays using rodents: A systematic review*. 82p. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the excessive fat accumulation in the liver, which may compromise the function of this organ and progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. This condition affects around 25% of the adult population and its increasing prevalence constitutes a major threat to public health. Evidence reinforces the idea that diet indeed plays a central role in NAFLD pathogenesis. Not only the amount of intake, but also the type of dietary fat - including chemically modified lipids, such as interesterified and *trans* fats - may influence the disease development. Rodent models have been widely used to understand the NAFLD pathogenesis and mimic the human disease in preclinical assays. However, the heterogeneity of diets, the little attention directed at the source of the dietary components and a lack of standardization of control groups may compromise the accuracy and interpretation of the studies' findings, even questioning the theory that chemically modified lipids' consumption is linked to deleterious effects. Thus, we systematically assessed the preclinical literature examining the composition of diets used in assays with chemically modified lipids and rodent models of NAFLD, and the effects of those dietary interventions. The search was conducted on the *MEDLINE* electronic database in December 2020. Only articles published in English after 1993 were included. Data was extracted from graphs and tables of included studies with the use of a digitizing *software*. In total, 2132 studies were retrieved. 1042 studies were excluded in the first screening phase, and 1086 in the second. A total of 6 studies were included in the analysis. The lack of interventions enriched in fat or with chemically modified fats, the use of transgenic models, *in vitro* studies, chemical/pharmacological induction of NAFLD and insufficient information about the diet were frequent exclusion criteria. The most pronounced differences were in relation to diet composition and the period of intervention. Although there are several studies on the effects of high-fat diets on steatosis, there is a gap in the knowledge of how the inclusion of chemically modified fats may influence the development of NAFLD, due to several confusion variables. The findings of pre-clinical studies are insufficient, and the heterogeneity of the experiments prevent the summarization of evidence and may reduce the data's validity in assessing the effects of chemically modified fat intake in the onset and progression of NAFLD.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease. Interesterified fat. *Trans* fat. Chemically modified fat. Systematic review.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estados progressivos da doença hepática gordurosa não-alcoólica .....	17
Figura 2 –	Múltiplos <i>hits</i> associados ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica .....	19
Figura 3 –	Estrutura dos ácidos graxos e sistema de numeração estereoespecífico ....	28
Figura 4 –	A e B – Interesterificação: esquema representando as moléculas de triacilglicerol contendo três ácidos graxos .....	32
Figura 5 –	Fluxograma com a busca e seleção de estudos na revisão sistemática .....	42
Figura 6 –	Gráfico de risco de viés dos estudos avaliados .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Termos usados na busca de artigos no banco de dados <i>MEDLINE</i> .....	31
Tabela 2 –	Análise de risco de viés usada na revisão, adaptada a partir da ferramenta da SYRCLE .....	35
Tabela 3 –	Informações básicas sobre o desenho experimental dos estudos .....	41
Tabela 4 –	Porcentagem de quilocalorias proveniente de lipídios e de gramas de sacarose das dietas utilizadas nos estudos analisados .....	44
Tabela 5 –	Efeitos da dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada sobre a esteatose nos estudos incluídos .....	47
Tabela 6 –	Esteatose hepática .....	49
Tabela 7 –	Desfechos secundários avaliados nos estudos analisados .....	50
Tabela 8 –	Peso Corporal .....	50
Tabela 9 –	Risco de viés dos estudos avaliados .....	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGT -	Ácidos Graxos <i>Trans</i>
ALT -	Alanina Aminotransferase
AMPK -	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina)
AST -	Aspartato Aminotransferase
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCNT -	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DHGNA -	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DNA -	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
ERO -	Espécies Reativas de Oxigênio
GI -	Gorduras Interesterificadas
GPx -	Glutationa peroxidase
HDL -	<i>High-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de Alta Densidade)
Hh -	<i>Hedgehog</i>
IKK -	I $\kappa$ B Quinase
IL-1 $\beta$ -	Interleucina 1 Beta
IL-6 -	Interleucina 6
IL-10 -	Interleucina 10
iNOS -	<i>inducible Nitric oxide synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Indutível)
JNK -	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> (Quinase c-Jun N-terminal)
Kcal -	<i>kilocalorie</i> (Quilocaloria)
LDL -	<i>Low-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LPS -	Lipopolissacarídeo
MCP-1 -	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> (Proteína Quimiotática de Monócitos 1)
MDA -	Malondialdeído
MMP -	<i>Matrix Metalloproteinase</i> (Metaloproteinases de Matriz)
mTor -	<i>mammalian Target of rapamycin</i> (Alvo de Rapamicina em

Mamíferos)

NAS -	<i>Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score</i> (Escore de Atividade de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica)
NF-κB -	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (Fator Nuclear Kappa B)
OMS-	Organização Mundial de Saúde
PAI-1-	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i> (Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1)
PDGF -	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)
PPAR-	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i> (Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma)
RBP-4-	<i>Retinol Binding Protein 4</i> (Proteína Ligante de Retinol 4)
RNA -	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
SOCS1 -	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 1</i> (Supressor da Sinalização de Citocina 1)
SOD -	Superóxido Dismutase
SREBP-1 -	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1</i> (Proteína de Ligação ao Elemento Regulador de Esterol 1)
TGFβ1 -	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i> (Fator de Crescimento Transformador Beta 1)
TLR -	<i>Toll-Like Receptor</i> (Receptor do Tipo Toll)
TNF-α-	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
VLDL -	<i>Very Low Density Lipoproteins</i> (Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade)

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1	Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica.....	17
2.2	Ácidos graxos .....	26
2.3	Gorduras quimicamente modificadas .....	28
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	33
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
4.1	Objetivo Geral .....	35
4.2	Objetivos específicos .....	35
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.1	Registro de protocolo .....	36
5.2	Busca de artigos científicos em base de dados .....	36
5.3	Seleção de estudos .....	37
5.4	Extração de dados .....	38
5.5	Avaliação de risco de viés .....	39
5.6	Análise de dados .....	40
6	<b>RESULTADOS</b> .....	42
6.1	Resultados da busca .....	42
6.2	Características dos estudos .....	44
6.2.1	<u>Animais utilizados</u> .....	44
6.2.2	<u>Período da dieta</u> .....	44
6.2.3	<u>Gorduras quimicamente modificadas avaliadas</u> .....	44
6.2.4	<u>Porcentagens de gordura na intervenção hiperlipídica com gordura quimicamente modificada</u> .....	45
6.2.6	<u>Intervenção normolipídica com gordura quimicamente modificada</u> .....	47
6.2.7	<u>Sacarose nas dietas</u> .....	47
6.2.8	<u>Avaliação de esteatose hepática</u> .....	48
6.3	Desfechos dos estudos .....	50
6.3.1	<u>Desfecho primário</u> .....	50
6.3.2	<u>Desfechos secundários</u> .....	52
6.4	Risco de viés .....	56
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
	<b>APÊNDICE A - Protocolo do PROSPERO</b> .....	72

<b>APÊNDICE B - Critérios de exclusão dos artigos</b> .....	79
<b>ANEXO A – Divulgação Científica</b> .....	82

## INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença crônica não transmissível (DCNT) definida como a presença de esteatose hepática excedendo 5% do peso do fígado, em um paciente sem um histórico significativo de uso de álcool e sem outras doenças hepáticas que levem ao acúmulo de gordura no fígado (FIELDING; ANGULO, 2014; YOUNOSSI et al., 2016). Sua prevalência vem crescendo em todo o mundo, atualmente acometendo um quarto da população adulta mundial (YOUNOSSI et al., 2016). Além disso, possui alta relevância epidemiológica na América do Sul, que tem a maior prevalência da doença, presente em 31% de sua população adulta devido aos fatores genéticos e ambientais, importantes para seu desenvolvimento (OLIVEIRA; COTRIM; ARRESE, 2019; WHO, 2014; YOUNOSSI et al., 2016)

A dieta inadequada é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como obesidade, diabetes, câncer e doenças hepáticas (WHO, 2014). Dentre os fatores dietéticos, o padrão de consumo de lipídios de um indivíduo está intimamente relacionado à sua saúde e ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas como a DHGNA (GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS et al., 2017; MALTA et al., 2014; SALES et al., 2018; SCHMIDT et al., 2011). Sabe-se, ainda, que não só a quantidade de lipídios, mas também o tipo de ácido graxo consumido tem grande importância nesse processo, uma vez que a qualidade dos lipídios da dieta pode ter um papel importante no desenvolvimento de distúrbios metabólicos causados pela alteração na comunicação entre adipócitos, fígado e músculo esquelético (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; PINEL et al., 2018; SALES et al., 2018).

Lipídios quimicamente modificados, como gorduras parcialmente hidrogenadas ( que são fontes de ácidos graxos *trans* (AGT)) e gorduras interesterificadas (GI), têm sido largamente utilizados na indústria alimentícia a fim de elaborar produtos com características sensoriais satisfatórias e mais atraentes aos consumidores (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007). Inicialmente, as gorduras parcialmente hidrogenadas foram utilizadas pela indústria de alimentos como substitutos dos ácidos graxos saturados (AGS), os quais estão relacionados a maiores concentrações séricas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e colesterol total, estímulo a respostas inflamatórias e acúmulo de gordura hepática e visceral, representando um maior risco cardiovascular e levando a outras doenças metabólicas (ALFIERI et al., 2017;

ISMAIL et al., 2018; ROGERO; CALDER, 2018; ROSQVIST et al., 2014). Apesar de ser vista, inicialmente, como uma alternativa saudável e reunir aspectos desejáveis para a indústria, o consumo das gorduras *trans* foi associado a diversos danos à saúde e a uma maior mortalidade, aumentando concentrações lipídicas séricas, inflamação, estresse oxidativo e peso corporal, além de prejudicar a sensibilidade à insulina (GEBAUER; PSOTA; KRIS-ETHERTON, 2007). Dessa forma, o consumo dos AGT aumenta o risco de desenvolvimento de desordens metabólicas como obesidade e DHGNA (ASCHERIO; WILLETT, 1997; GEBAUER; PSOTA; KRIS-ETHERTON, 2007; GINTER; SIMKO, 2016; MANTOVANI, 2018; MICHA; MOZAFFARIAN, 2008; WILCZEK; OLSZEWSKI; KRUPIENICZ, 2017).

Devido aos efeitos deletérios atribuídos aos AGT, em 2017, no Brasil, foi sancionado, pelo Senado, o Projeto de Lei nº 478, determinando que alimentos não poderiam conter AGT, além de incentivar as pesquisas que buscassem formular gorduras para a substituição dos AGT e das gorduras saturadas dos produtos. Além disso, em 2019, foi publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 332/2019, que limita o uso de gorduras *trans* industriais em alimentos e serviços de alimentação, com a norma sendo implantada em fases até o banimento do uso da gordura parcialmente hidrogenada até o ano de 2023. No entanto, foram publicadas outras resoluções que alteram a RDC 332 e estendem o tempo de venda desses produtos, mantendo a população vulnerável a consumir este tipo de gordura (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; MATHIAS, 2021).

Ainda assim, mediante o contexto nacional e internacional em que vários países já limitaram e aplicaram sanções ao uso de gorduras *trans* (ALFIERI et al., 2017; GINTER; SIMKO, 2016; WILCZEK; OLSZEWSKI; KRUPIENICZ, 2017), a indústria de alimentos passou a utilizar as gorduras interesterificadas. Atualmente, essas gorduras já estão presentes em diversos produtos ultraprocessados, uma vez que, assim como os AGT, as GI também conferem propriedades interessantes para a indústria, como sabor e textura (ALFIERI et al., 2017; SANTOS et al., 2013).

Embora apresentem características satisfatórias do ponto de vista industrial, as gorduras interesterificadas ainda são motivo de grande preocupação por parte de pesquisadores da área da saúde, uma vez que estudos utilizando este tipo de gordura ainda apresentam resultados muito controversos com relação aos seus efeitos, principalmente a longo prazo, no metabolismo (BERRY et al., 2019; MILLS; HALL; BERRY, 2017; SANTOS et al., 2013). Alguns trabalhos apontam que o uso das GI é positivo por diminuir o conteúdo de ácidos graxos saturados da dieta, e que seu consumo não mostra mudanças significativas no metabolismo lipídico e em biomarcadores de doenças cardiovasculares (BERRY et al., 2019). Ou, ainda, que a inclusão das GI na dieta apresentou efeitos positivos sobre os perfis de lipoproteínas plasmáticas, reduziu a concentração de triacilglicerol no plasma e o risco de doenças cardiovasculares (ALFIERI et al., 2017). Essas gorduras, no entanto, também já demonstraram diversos efeitos negativos em outros

estudos, como disfunção mitocondrial hepática, alteração na homeostase de glicose, predisposição a distúrbios metabólicos, inibição da ação da insulina e desenvolvimento de fibrogênese, inflamação e esteatohepatite não- alcoólica (ALFIERI et al., 2017; BISPO et al., 2015; LAVRADOR et al., 2019; SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007; VELASCO et al., 2017).

Dessa forma, frente aos resultados controversos em relação aos impactos do consumo de gorduras quimicamente modificadas sobre o organismo, é de grande importância buscar a elucidação do impacto do seu consumo no desenvolvimento da DHGNA. Além disso, a fisiopatogenia da DHGNA ainda não foi totalmente compreendida, sendo necessária a utilização de modelos pré-clínicos - em especial camundongos, por conta da proximidade das alterações metabólicas frente a dietas hiperlipídicas e também devido ao seu baixo custo - ainda são muito utilizados para que se entenda o desenvolvimento da doença hepática (OLIGSCHLAEGER; SHIRI-SVERDLOV, 2020). Compreender como estudos pré-clínicos sobre o consumo de gorduras *trans* e interesterificadas são conduzidos – em termos de composição de dieta e modelos animais – é necessário para avaliar a acurácia dos resultados dos experimentos, levando a um melhor conhecimento de como essas gorduras podem levar à DHGNA, como impactam a saúde humana e como melhor conduzir trabalhos sobre os efeitos da inclusão das gorduras quimicamente modificadas na dieta, evitando, ainda, críticas como aquelas feitas aos estudos com óleo de palma, apontando fatores de confusão e a inclusão de outros itens alimentares na dieta que possam influenciar os resultados (ISMAIL et al., 2018).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença crônica não transmissível (DCNT) definida como a presença de esteatose hepática – o acúmulo intracelular de triglicerídeos no fígado, ou seja, o acúmulo de gotículas macrovesiculares ou microvesiculares de lipídios ricas em triglicerídeos no interior dos hepatócitos (NASSIR et al., 2015) – excedendo 5% do peso do fígado por biópsia ou espectroscopia de ressonância magnética num paciente sem um histórico significativo de uso de álcool e sem outras condições hepáticas que causem o quadro de acúmulo de gordura no fígado, como hepatite viral, uso de medicamentos que induzem esteatose e outras doenças hepáticas crônicas como hepatite autoimune, hemocromatose e Doença de Wilson (FIELDING; ANGULO, 2014; YOUNOSSI et al., 2016).

Pacientes com DHGNA geralmente apresentam comorbidades, e não apenas o quadro hepático de acúmulo de gordura: tendem a ser obesos, terem resistência à insulina ou diabetes tipo 2, hiperlipidemia/dislipidemia e hipertensão arterial, sendo todas essas condições fatores de risco para doenças cardiovasculares (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011; YOUNOSSI et al., 2016). Além do risco conjunto, a DHGNA já é uma ameaça à saúde mesmo se for a única morbidade presente pois, além de aumentar o risco cardiovascular, ela é considerada um espectro de doença hepática, englobando a esteatose hepática com pouca ou nenhuma inflamação, mas também podendo levar a quadros progressivos de esteatohepatite não-alcoólica, fibrose hepática, cirrose e câncer hepático (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; CALZADILLA BERTOT; ADAMS, 2016; YILMAZ, 2012). Estimativas apontam que a DHGNA pode se tornar a principal causa de transplantes de fígado nos próximos anos (CALZADILLA BERTOT; ADAMS, 2016).

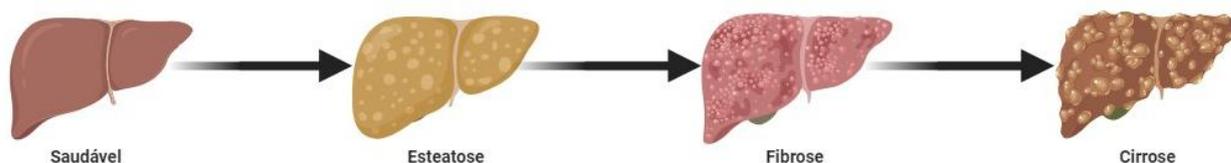


Figura 1. Estados progressivos de doença hepática gordurosa não-alcoólica. Fonte: o autor. Imagem criada com uso da versão gratuita do *software Biorender*.

A prevalência da DHGNA vem crescendo assim como a das outras DCNT uma vez que a prevalência global da doença era de aproximadamente 15% em 2005, e, atualmente, alcança aproximadamente 25%, correspondendo assim a um quarto da população adulta mundial (YOUNOSSI et al., 2016). Esse aumento é consistente com o avanço internacional da obesidade,

considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (CALZADILLA BERTOT; ADAMS, 2016; POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2019; YOUNOSSI et al., 2016). Indivíduos obesos têm 3,5 vezes mais chance de desenvolver DHGNA do que indivíduos eutróficos (LI et al., 2016), e a incidência aumentada da obesidade é a maior contribuinte para o aumento global da prevalência desta doença. A associação entre essas duas comorbidades é considerada uma das principais crises da saúde da próxima década (YOUNOSSI et al., 2018; YOUNOSSI; HENRY, 2016).

Apesar de a DHGNA ter alta relevância epidemiológica em todos os continentes, há diferenças regionais. A América do Sul tem a maior prevalência da doença, de aproximadamente 31%, provavelmente por um conjunto de fatores genéticos e ambientais, como dieta inadequada, sedentarismo, consumo de álcool, prevalência de síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (OLIVEIRA; COTRIM; ARRESE, 2019; YOUNOSSI et al., 2016). Não há dados específicos sobre a prevalência de DHGNA no Brasil. No entanto, supõe-se que ela seja significativa, dado que o país apresenta diversas características comuns à região da América do Sul, na qual a nação se encontra. Uma alta porcentagem da população brasileira é afetada por comorbidades associadas à DHGNA, que atuam como fatores de risco para seu desenvolvimento: mais da metade da população possui sobrepeso, e, aproximadamente, 20% tem obesidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019); e, em 2019, era o quinto país com o maior número de adultos diabéticos do mundo, apresentando uma prevalência nacional de diabetes de 11,4% e afetando cerca de 16,8 milhões de pessoas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Além disso, em 2019, cerca de 44,8% da população adulta brasileira apresentava um grau de atividade física considerado insuficiente, e 13,9% foram considerados fisicamente inativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Tendo inúmeros fatores de risco, a fisiopatogenia da doença hepática gordurosa não alcoólica não é simples. Os mecanismos que levam ao desenvolvimento e progressão da DHGNA são complexos e multifatoriais: fatores genéticos, ambientais e dietéticos estão envolvidos, podendo levar a outras condições associadas ao diagnóstico de doença hepática. Atualmente, a hipótese mais aceita é a dos “múltiplos *hits*”, que sugere que vários insultos afetam o organismo de forma conjunta, induzindo o estabelecimento da DHGNA. A resistência à insulina, obesidade e função endócrina do tecido adiposo, fatores nutricionais, mudanças na microbiota intestinal e fatores genéticos e epigenéticos são considerados insultos capazes de levar a esse quadro (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Além disso, é importante destacar que não há uma sequência exata que defina uma lesão hepática inicial: a ordem e a combinação de eventos genéticos, externos e intracelulares resultam no quadro patológico, e não a mera soma de insultos. Assim, a combinação e a sucessão de danos distintos podem levar à ativação de vias diferentes que podem resultar no desenvolvimento de esteatose simples ou estados progressivos de doença hepática (YILMAZ, 2012).

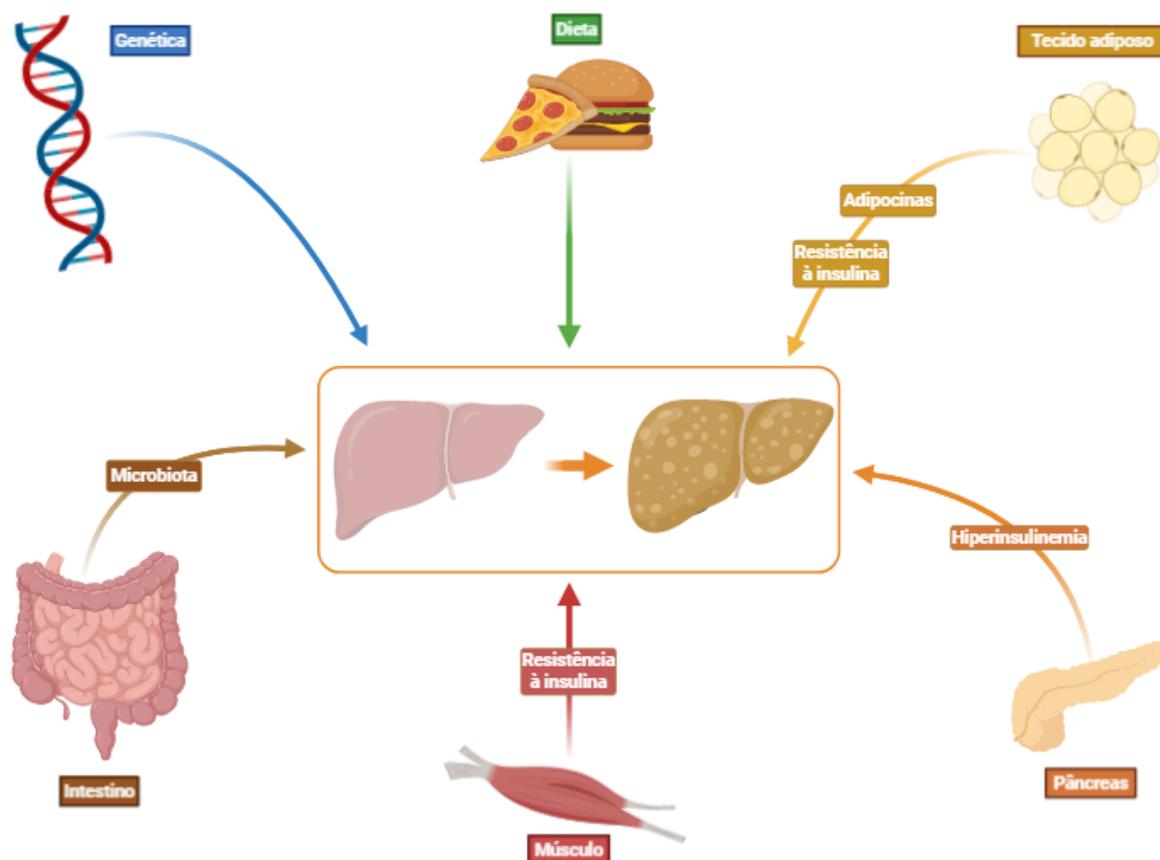


Figura 2. Múltiplos *hits* associados ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica. Adaptado de (MARCHISELLO et al., 2019. Imagem criada com uso da versão gratuita do *software* Biorender.

A resistência à insulina é crucial no desenvolvimento da DHGNA e da possível progressão à esteatohepatite não-alcoólica, sendo um fator essencial para o estabelecimento da lipotoxicidade, estresse oxidativo e ativação da cascata inflamatória (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). Em primeiro lugar, essa condição metabólica e a hiperinsulinemia induzem um aumento da lipogênese *de novo* – via metabólica em que ácidos graxos são sintetizados a partir de carboidratos em excesso (AMEER et al., 2014) – no fígado, além de prejudicar a inibição da lipólise – processo de degradação de lipídios por hidrólise, gerando, ao final, glicerol e ácidos graxos (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2010; STEFAN; KANTARTZIS; HÄRING, 2008) – no tecido adiposo. A consequência é um fluxo aumentado de ácidos graxos para o fígado (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

Dessa forma, a resistência à insulina tem um impacto sistêmico, levando à lipotoxicidade em vários órgãos (CUSI, 2009), a qual é caracterizada por uma concentração aumentada de lipídios, excesso de ácidos graxos livres e gordura ectópica (MENDEZ-SANCHEZ et al., 2018; MOTA et al., 2016) (comum na obesidade, em que há acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo e em tecidos não-adiposos), resultando num conjunto de efeitos deletérios capaz de causar disfunção tecidual e/ou morte celular (CUSI, 2009; MENDEZ-SANCHEZ et al., 2018).

Na obesidade, a ingestão energética exagerada se combina à alta saída de ácidos graxos livres do tecido adiposo resistente à insulina, assim ultrapassando a capacidade de armazenamento e de oxidação de tecidos não-adiposos, como o tecido muscular esquelético, tecido hepático e células  $\beta$ -pancreáticas (CUSI, 2009; MENDEZ-SANCHEZ et al., 2018). A relação entre a lipotoxicidade e a resistência à insulina é, portanto, de retroalimentação positiva. A diabetes mellitus tipo 2 é considerada uma consequência direta da lipotoxicidade, que promove resistência à insulina e acelera a falência das células  $\beta$ -pancreáticas (CUSI, 2009), gerando um ciclo que deteriora a homeostase.

Concentrações aumentadas de ácidos graxos livres oriundos do tecido adiposo no plasma estão envolvidos na progressão de um quadro “pré-diabético” para um de diabetes mellitus tipo 2, induzindo defeitos em vias de sinalização da insulina por ativação da serina-quinase, sendo redirecionados para vias prejudiciais do metabolismo não-oxidativo e estando envolvidos no acúmulo intracelular de metabólitos tóxicos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; CUSI, 2009). Na lipotoxicidade, então, não é o acúmulo de triglicerídeos em si que danifica o organismo, mas sim os metabólitos derivados de lipídios, que desencadeiam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativação de vias inflamatórias (CUSI, 2009), que por sua vez deflagram seus próprios efeitos. Quando há ácidos graxos livres em excesso, obesidade e resistência à insulina, a lipotoxicidade parece ser a promotora central do dano celular no fígado, via estresse oxidativo, ocasionando apoptose e senescência de hepatócitos, que contribuem para a ativação dos inflamassomas – complexos multiproteicos que agem como sensores de moléculas derivadas de microrganismos patogênicos ou liberadas por células danificadas, podendo desencadear inflamação – por uma variedade de mecanismos de sinalização intra e intercelulares, levando à fibrose (PEVERILL; POWELL; SKOEN, 2014).

A obesidade – que, como já citado, é um importante componente na fisiopatogenia da DHGNA – tem a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo como principal característica (SHEN et al., 2003), o que contribui para o *turnover* aumentado de ácidos graxos livres, e também para outro fator importante no desenvolvimento da DHGNA: a resistência à insulina (BUGIANESI et al., 2010). Os adipócitos hipertrofiados secretam citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês “*tumoral necrosis factor*”), interleucina 6 (IL-6), resistina, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês “*monocyte chemoattractant protein*”), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1, do inglês “*plasminogen activator inhibitor*”), visfatina, angiotensinogênio e proteína ligante de retinol 4 (RBP-4, do inglês “*retinol binding protein*”) que são chamados de adipocinas (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013; CUSI, 2009). As citocinas inflamatórias medeiam resistência à insulina, aprofundando a ligação entre a gordura corporal e essa condição metabólica. Tal mediação é feita de diferentes formas: diretamente, por meio da promoção da fosforilação em serina e, portanto, inibição de etapas da via de sinalização da insulina no fígado e nos músculos, ou indiretamente, ao ativar

macrófagos por meio da liberação de uma série de citocinas perto de células do tecido adiposo que promovem resistência à insulina, níveis aumentados de ácidos graxos livres no plasma e, conseqüentemente, lipotoxicidade (CUSI, 2009). Num quadro de obesidade, a hipertrofia de adipócitos – afetados por condições como excesso de energia, inflamação, resistência à insulina e estresse de organelas – resulta num desequilíbrio das adipocinas, que pode afetar não só o tecido adiposo em si, mas também o fígado, desequilibrando a homeostase metabólica (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007).

O tecido adiposo também contribui para a manutenção de um estado inflamatório de baixo grau ao produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , cuja expressão se encontra aumentada nos adipócitos de pacientes obesos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Os adipócitos não são as únicas células do tecido adiposo: este também é infiltrado com macrófagos, cuja importância na função secretória é considerável, dado que são a principal fonte de citocinas inflamatórias, como as supracitadas TNF- $\alpha$  e IL-6 (COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013; CUSI, 2009; KOLAK et al., 2007). Além disso, a ativação de macrófagos no tecido adiposo visceral e subcutâneo de pacientes com DHGNA se correlaciona com a progressão da esteatose simples para esteatohepatite não-alcoólica e fibrose hepática (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Adicionalmente, a resistência à insulina é regulada por mediadores liberados por células do sistema imune ou adipócitos, e citocinas como o TNF- $\alpha$ , também importante na patogenia de doenças hepáticas (TILG; HOTAMISLIGIL, 2006).

A disfunção nos adipócitos também é marcada por níveis reduzidos de adiponectina no plasma, como registrado nos quadros patológicos de DHGNA, esteatohepatite não-alcoólica, obesidade e diabetes tipo 2 (CUSI, 2009). A adiponectina é uma adipocina com ação anti-inflamatória, antifibrótica, antiaterosclerótica e hepatoprotetora, associada com a melhora da resistência à insulina hepática e periférica, e portanto, sendo considerada antidiabética (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; IWABU et al., 2010; TILG; HOTAMISLIGIL, 2006). Ela é sintetizada principalmente pelos adipócitos, mas também é produzida por células musculares esqueléticas, miócitos cardíacos e células endoteliais (TILG; MOSCHEN, 2006). Os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina são alcançados pelo bloqueio da ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês “*nuclear factor kappa B*”), pela secreção de citocinas anti-inflamatórias e inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). O bloqueio do NF- $\kappa$ B é essencial, visto que este é um complexo proteico que age como fator de transcrição, sendo um regulador primário da ativação inflamatória (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Indivíduos obesos e em estados de resistência à insulina – como na diabetes tipo 2 e na própria DHGNA – apresentam uma queda nas concentrações séricas de adiponectina, que se correlacionam inversamente com a resistência à insulina (TILG; MOSCHEN, 2006). Já os efeitos antiaterosclerótico e de

sensibilização à insulina da adiponectina são mediados por outra via, estando ligados principalmente à ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e receptor ativado por proliferadores de peroxissomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (ADACHI; BRENNER, 2008).

Sabe-se que concentrações reduzidas de adiponectina estão intimamente associadas ao aumento do grau de esteatose hepática, necroinflamação e fibrose na DHGNA, afinal, a adiponectina também apresenta ação antifibrótica no fígado ao suprimir a fibrogênese, inibindo a proliferação das chamadas “células estreladas hepáticas”, que respondem a danos e morte celulares, e contam com componentes do inflamassoma que regulam várias de suas funções, importantes para o desenvolvimento de fibrose hepática (ADACHI; BRENNER, 2008; TILG; MOSCHEN, 2006; WATANABE et al., 2009). Os efeitos antioxidantes da adiponectina, por sua vez, são mediados por seu receptor AdipoR1, que tem um importante papel na regulação do metabolismo da glicose e de lipídios, inflamação e estresse oxidativo; portanto, os níveis reduzidos de adiponectina e AdipoR1 na obesidade podem ter relação causal com a disfunção mitocondrial e resistência à insulina (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; IWABU et al., 2010). Além disso, pacientes obesos, devido ao quadro de adiponectina diminuída e hiperleptinemia, podem apresentar esteatose hepática e ativação de inflamação e fibrogênese. Esse quadro é associado à resistência à leptina, normalmente observada em pacientes obesos com síndrome metabólica (TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2006). A hiperleptinemia e concentrações reduzidas de adiponectina foram descritas em pacientes com esteatohepatite não-alcóolica, um possível estágio de progressão da DHGNA (TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2006).

A leptina age como hormônio anorexígeno, tendo propriedades pró-inflamatórias e prevenindo o acúmulo de lipídios em sítios não-adiposos, o que é feito no fígado por meio da diminuição da expressão da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP-1), um fator de transcrição que atua regulando a ativação da lipogênese *de novo* e a homeostase celular de colesterol, podendo ser estimulado por insulina; na DHGNA, as etapas de homeostase de colesterol que envolvem a SREBP-1 estão desreguladas, levando ao acúmulo de colesterol e lipotoxicidade (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; IIKUNI et al., 2008; MOON, 2017; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2013). Apesar de sua ação anorexígena, as concentrações de leptina são elevadas na obesidade devido à resistência desenvolvida pelo organismo às suas ações (TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2009, 2006). Assim, a leptina também age em insultos que contribuem para o desenvolvimento da DHGNA, contribuindo para a resistência à insulina e, conseqüentemente, esteatose, bem como aumentando concentrações de TNF- $\alpha$  e amplificando inflamação (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2015; TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2006). A leptina possui efeito fibrogênico, exercido por meio de células-alvo, que incluem as células endoteliais, células de Kupffer e células hepáticas estreladas. Para essas últimas, a leptina age

como potente mitógeno, inibindo sua apoptose (TSOCHATZIS; PAPTAEODORIDIS; ARCHIMANDRITIS, 2009, 2006).

A leptina estimula as células Kupffer a produzir o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), que por sua vez medeia outros efeitos, como a fibrose hepática e a ativação das células hepáticas estreladas. Além da ativação indireta, as células hepáticas estreladas são ativadas pela leptina pelas vias da hedgehog (Hh) e do alvo de rapamicina em mamíferos (mTor, do inglês “*mammalian target of rapamycin*”), ambas de importância no estabelecimento e severidade do dano hepático (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; KUBRUSLY et al., 2010; MACHADO; DIEHL, 2018; WANG et al., 2009).

As já citadas células Kupffer são macrófagos especializados residentes do fígado, e realizam uma gama de funções especializadas, como fagocitose, processamento e apresentação de antígenos (STIENSTRA et al., 2010), geração de prostanoídes, óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio, e mediação da liberação de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e IL-18, liberadas quando seus “receptores do tipo Toll” (TLR) respondem a gatilhos, como o lipopolissacarídeo (LPS), um dos principais produtos bacterianos tóxicos, por exemplo (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). As células Kupffer também agem para estimular respostas fibrogênicas por meio da produção de TGF $\beta 1$ , metaloproteinases de matriz (MMPs), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). Além disso, são responsáveis por recrutamento de neutrófilos (PEVERILL; POWELL; SKOIEN, 2014). Por essas ações, as células Kupffer influenciam fenótipos de células parenquimais, estreladas e endoteliais vizinhas, além de estarem envolvidas na patogênese de várias doenças hepáticas, desde hepatite viral até a esteatohepatite, doença hepática alcoólica e a já citada fibrose hepática (STIENSTRA et al., 2010)(STIENSTRA et al., 2010).

O acúmulo excessivo de gordura no fígado, portanto, pode derivar de diversos processos combinados: entrega ou síntese aumentada de gordura, menor oxidação ou menor exportação da gordura na forma de VLDL (POSTIC; GIRARD, 2008). Sendo assim, os mecanismos que levam ao excesso de triglicerídeos hepáticos são ligados, em especial, à chegada aumentada de ácidos graxos não-esterificados de tecido adiposo periférico expandido ao fígado, e à síntese lipídica hepática *de novo* aumentada pela via lipogênica do próprio fígado (POSTIC; GIRARD, 2008).

Somado ao que já foi descrito anteriormente, sabe-se, ainda, que o estresse oxidativo também é um importante fator na progressão da esteatose simples para um quadro de esteatohepatite não-alcoólica, podendo ser gerado de várias formas, como na oxidação de ácidos graxos, citocromo P4502E1, excesso de ferro, e citocinas inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ . O estresse oxidativo pode desencadear dano a membranas celulares e DNA nuclear, resultando em peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA, respectivamente (SEKI; KITADA;

SAKAGUCHI, 2005).

A patogênese da DHGNA também é influenciada por alterações morfofuncionais na mitocôndria. Dentre as alterações estruturais, figuram a depleção do DNA mitocondrial e mudanças morfológicas e ultraestruturais, enquanto dentre as alterações funcionais estão desregulações na cadeia respiratória e na  $\beta$ -oxidação mitocondrial (PESSAYRE; FROMENTY, 2005). Caso as funções mitocondrial e/ou peroxissomal não sejam capazes de lidar com o fluxo aumentado de lipídios, a oxidação respiratória pode colapsar, comprometendo a homeostase de gordura e gerando metabólitos tóxicos derivados de lipídios, além da superprodução de ERO (BEGRICHE et al., 2006). Em quadros de esteatohepatite não-alcoólica com resistência à insulina, a  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos pode ser aumentada, bem como a geração de ERO pela cadeia respiratória danificada. Em um ambiente rico em lipídios, a geração de espécies reativas de oxigênio induz peroxidação lipídica, que por sua vez libera derivados aldeídicos altamente reativos que danificam hepatócitos e outras células hepáticas (BEGRICHE et al., 2006). Nos hepatócitos, as espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e produtos da peroxidação lipídica danificam ainda mais a cadeia respiratória, por vias diretas ou indiretas. Neste último caso, por meio do dano oxidativo ao genoma mitocondrial, levando à geração subsequente de mais ERO, estabelecendo um ciclo (BEGRICHE et al., 2006). Além disso, as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em reações alteradas de oxidação-redução que atacam macromoléculas celulares e são detectadas no fígado de pacientes com DHGNA (PODRINI et al., 2013).

ERO e produtos da peroxidação lipídica também aumentam a produção de várias citocinas, tendo papel importante na fibrose, inflamação e na própria morte celular (BEGRICHE et al., 2006). Os metabólitos tóxicos derivados dos lipídios e espécies reativas de oxigênio contribuem para o processo de necroinflamação dos hepatócitos e piora do dano mitocondrial, visto que ativam vias inflamatórias e levam à lipotoxicidade nos hepatócitos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; CUSI, 2009). Assim, a disfunção mitocondrial também exerce um papel importante na fisiopatogenia da DHGNA uma vez que o estresse oxidativo é crucial à produção de danos letais aos hepatócitos. Além disso, junto de partículas oxidadas de LDL, as ERO podem ativar células Kupffer e células hepáticas estreladas, levando à inflamação e fibrose (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

O estado inflamatório da DHGNA é estabelecido por diversos fatores: os níveis aumentados de ácidos graxos livres e consequente lipotoxicidade, resistência à insulina, disfunção do tecido adiposo periférico e endotoxinas derivadas do trato gastrointestinal agem em conjunto, ativando e mantendo produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tanto sistemicamente quanto localmente no fígado (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

A produção hepática de citocinas é chave para a progressão de uma simples esteatose para um quadro de esteatohepatite não-alcoólica. Estudos em modelos animais demonstram que níveis

aumentados de citocinas pró-inflamatórias no fígado levam a necrose e apoptose, quimiotaxia de neutrófilos, ativação de células hepáticas estreladas e produção de corpos de Mallory – estruturas patológicas que podem ser encontradas no citoplasma de hepatócitos –, todas comuns na esteatohepatite não-alcoólica (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Além da determinação do desenvolvimento de DHGNA e esteatohepatite não- alcoólica, os níveis séricos e hepáticos de TNF- $\alpha$  também se correlacionam com a severidade histológica do dano hepático (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; CRESPO et al., 2001; SEO et al., 2013). Já a ativação de NF- $\kappa$ B é correlacionada à carcinogênese, portanto, o estado de inflamação crônica na DHGNA pode ter papel no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Mesmo que a patogênese do câncer não seja totalmente conhecida, sabe-se que ambas a exposição a carcinógenos e a inflamação crônica são importantes no estabelecimento de tumores, sendo a última responsável por aproximadamente 20% dos cânceres humanos (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; PIKARSKY et al., 2004).

Fatores dietéticos – tanto em termos de quantidade de ingestão calórica quanto de nutrientes específicos – são contribuintes para o desenvolvimento da DHGNA, esteatohepatite não-alcoólica e outras DCNT (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Diferentes contextos experimentais já demonstraram, por exemplo, que o consumo de determinados produtos, como refeições do tipo *fast food*, teve efeito potencializador em fatores como obesidade visceral, resistência à insulina, lipotoxicidade e estresse de retículo endoplasmático (ALWAHSH; GEBHARDT, 2017; BASARANOGU et al., 2013; BERGHEIM et al., 2008; BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017). A dieta inadequada, portanto, já é considerada como um fator de risco essencial para a DHGNA: o consumo excessivo de gordura, em especial, se correlaciona com o acúmulo de gordura no fígado (SALES et al., 2018). Dietas ricas em gordura podem induzir esteatose hepática mesmo quando não há aumento de peso corporal. Além disso, o acúmulo de gordura no fígado está envolvido com diferentes mecanismos moleculares, como a alteração da sinalização da insulina e a produção de ERO, ambos vistos como processos participantes da fisiopatogenia da DHGNA (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2010; SALES et al., 2018). O tipo de gordura da dieta é essencial na determinação do seu impacto sobre o organismo, com diferentes tipos de gorduras levando a diferentes efeitos sobre os hepatócitos (JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; SALES et al., 2018). Outros componentes, incluindo carboidratos, como frutose e sacarose, também influenciam no desenvolvimento da DHGNA; a sacarose ainda é muito utilizada em dietas experimentais para roedores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

## 2.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são a principal classe de lipídios da dieta humana e constituem os principais componentes da gordura, sendo parte da estrutura dos triacilgliceróis – que correspondem a aproximadamente 95% da gordura consumida na dieta (MILLS; HALL; BERRY, 2017) –, ésteres de colesterol e fosfolipídios (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007). Eles têm papel crucial em processos biológicos, como função, manutenção e respiração celular, crescimento tecidual e desenvolvimento do organismo, modulação de sinalização e comunicação inter e intracelular, controle de expressão gênica e regulação epigenética, além de serem componentes integrais da estrutura dos fosfolipídios das membranas celulares e mitocondriais, afetando sua estrutura e função (ALFIERI et al., 2017; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; VELASCO et al., 2017). Também representam uma grande fonte de energia para o organismo, além de participarem da absorção das vitaminas lipossolúveis: A, D, E e K (ALFIERI et al., 2017). Não só os ácidos graxos, mas também os seus metabólitos apresentam funções importantes: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos agem como moléculas lipofílicas bioativas e sinalizadoras (ALFIERI et al., 2017).

Com relação à sua estrutura, os ácidos graxos são cadeias lineares ácidas e monocarboxílicas de diferentes comprimentos e graus de saturação de suas cadeias de carbono. Podem ser classificados de acordo com o comprimento de suas cadeias: ácidos graxos de cadeia curta (tendo de 2 a 5 átomos de carbono), de cadeia média (tendo de 6 a 12 átomos de carbono) e de cadeia longa (tendo de 13 a 20 átomos de carbono) (ALFIERI et al., 2017). Também podem ser agrupados em três grandes categorias de acordo com o grau de saturação de suas cadeias carboxílicas: ácidos graxos saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (uma ligação dupla) e poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas) (ALFIERI et al., 2017). O comprimento, grau de saturação e a configuração molecular das ligações são importantes características dos ácidos graxos, capazes de produzir diferentes funções biológicas (JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Além da importância do estudo das propriedades físico-químicas dos ácidos graxos isoladamente, a sua participação na composição das gorduras também é crucial. A maioria das gorduras que ocorrem naturalmente são misturas de triacilgliceróis que carregam uma molécula de glicerol esterificada por três ácidos graxos. No suporte de glicerol das moléculas de triacilglicerol, os ácidos graxos ocupam uma das três posições, nomeadas como sn-1, sn-2 e sn-3, de acordo com o sistema de numeração estereoespecífico (sn) (ALFIERI et al., 2017). As posições sn-1 e sn-3 se referem aos ácidos graxos mais externos, e a posição sn-2, ao ácido graxo localizado no meio da molécula (MILLS; HALL; BERRY, 2017). A estereoespecificidade determina propriedades físicas e, conseqüentemente, biológicas do triacilglicerol, influenciando

sua absorção, metabolismo e captação pelos tecidos (ALFIERI et al., 2017). A estereoespecificidade é importante também porque há uma acetilação preferencial de ácidos graxos em posições específicas da molécula, o que leva a diferenças entre os óleos vegetais e gorduras animais (ALFIERI et al., 2017; MU; HØY, 2004). Em geral, a maioria dos óleos vegetais contém ácidos graxos saturados nas posições sn-1 e/ou sn-3, e ácidos graxos insaturados na posição sn-2; já as gorduras animais costumam ter ácidos graxos saturados na posição sn-2 e insaturados nas posições sn-1 e sn-3 (ALFIERI et al., 2017).

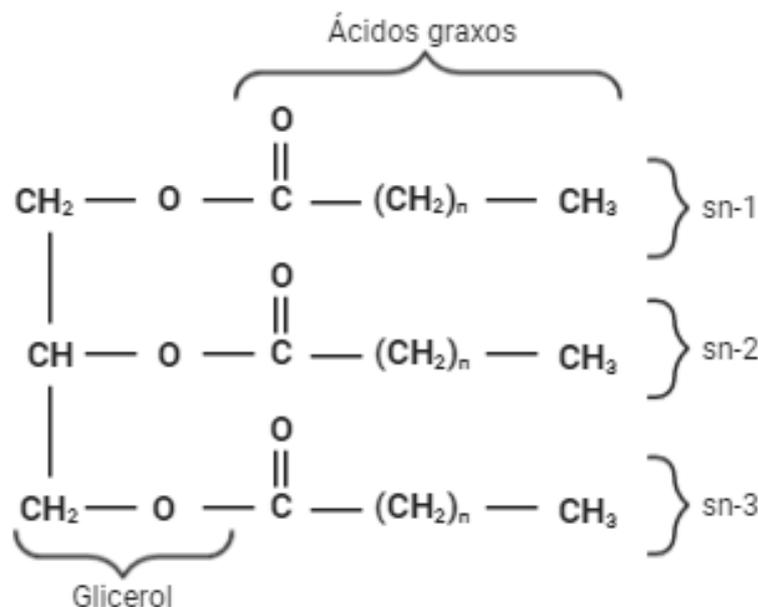


Figura 3. Estrutura dos ácidos graxos e sistema de numeração estereoespecífico. Adaptado de (ALFIERI et al., 2017; MILLS; HALL; BERRY, 2017). Imagem criada com uso do *software Microsoft Powerpoint*.

Apesar de sua importância na nutrição e organismo humanos, as diferentes classes de ácidos graxos vindas da dieta podem ser associadas a diferentes riscos à saúde, incluindo o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como a DHGNA (ALFIERI et al., 2017; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). Sabe-se que a quantidade de lipídios consumidos é importante: para humanos, a ingestão de energia a partir desse nutriente não deve exceder mais de 20-25%, e uma dieta com alto teor de gordura aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ALFIERI et al., 2017). A composição de ácidos graxos consumidos também é relacionada ao desenvolvimento da DHGNA, dado que aproximadamente 15% do triacilglicerol hepático é derivado da dieta (FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Portanto, características dos ácidos graxos – como a sua saturação – são importantes determinantes de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de DCNT. A saturação dos ácidos graxos consumidos na dieta pode influenciar a estrutura de bicamadas lipídicas, incluindo as membranas mitocondriais. Assim, influenciam na fluidez da membrana mitocondrial, podendo modificar funções respiratórias celulares, influenciando na produção de ERO e até mesmo na possível formação de um poro de transição de permeabilidade mitocondrial (KHAIRALLAH et

al., 2010; YU et al., 2014). Neste último caso, a morte celular necrótica pode levar a estados pró-inflamatórios (VELASCO et al., 2017). Outros fatores influenciados pelo conteúdo de gordura e saturação de ácidos graxos da dieta incluem funções de transportadores, dinâmica do cálcio, expressão gênica e modificações pós- traducionais de proteínas (YU et al., 2014).

A ingestão de excesso de ácidos graxos saturados está associada a efeitos deletérios ao organismo. Dentre eles, destacam-se o aumento da concentração sérica de LDL-c (ALFIERI et al., 2017) e colesterol total (ISMAIL et al., 2018) e o estímulo a respostas inflamatórias pelas vias de sinalização de TLR; além disso, os ácidos graxos saturados são componentes essenciais de endotoxinas bacterianas, incitando ainda mais a resposta inflamatória (ROGERO; CALDER, 2018). Adicionalmente, a suplementação dietética com ácidos graxos saturados está associada ao acúmulo de gordura hepática e visceral em humanos diabéticos (ROSQVIST et al., 2014). Uma redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares pode ser alcançada por meio da substituição parcial de ácidos graxos saturados por ácidos graxos insaturados em dietas abundantes em óleos vegetais, como os ácidos oleico e linoleico (ALFIERI et al., 2017). Além da saturação, o comprimento das cadeias também é crucial em seu efeito sobre a saúde: biomarcadores séricos de doença cardiovascular pioram quando o comprimento da cadeia do ácido graxo saturado é menor (ALFIERI et al., 2017).

Sabe-se, então, que não só a quantidade de lipídios, mas também o tipo de ácido graxo consumido na dieta é crucial na determinação do desenvolvimento de distúrbios metabólicos (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; JUÁREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; PINEL et al., 2018; SALES et al., 2018). Cada vez mais presentes na alimentação graças ao seu amplo uso pela indústria de alimentos, os lipídios quimicamente modificados devem ser estudados para que se entenda seus impactos sobre o organismo (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007).

### **2.3 Gorduras quimicamente modificadas**

As modificações químicas de óleos e gorduras têm como objetivo produzir gorduras que proporcionem um menor risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, o qual é relacionado ao consumo de ácidos graxos saturados na dieta. Para isso, a indústria de alimentos se aproveitou das propriedades químicas dos triacilgliceróis mais saudáveis presentes em óleos vegetais, quebrando suas ligações duplas e tornando-as simples por meio de reações de hidrogenação, processo químico de redução em que se aplica hidrogênio gasoso diretamente a uma substância. Sendo conduzida de forma incompleta, a hidrogenação parcial gera as gorduras parcialmente hidrogenadas (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007). A redução química aumenta os pontos de fusão dos óleos, e, portanto, permite sua transição para gorduras sólidas

em temperatura ambiente (ALFIERI et al., 2017). A hidrogenação parcial é justamente o processo utilizado pela indústria de alimentos na manufatura de gorduras semissólidas, interrompendo a reação antes de todas as ligações serem saturadas (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007). As gorduras parcialmente hidrogenadas reúnem um conjunto de características desejáveis do ponto de vista industrial: são baratas, e além de se manterem sólidas em temperatura ambiente, melhoram a textura e estabilidade, aumentando a validade e realçando a palatabilidade dos produtos em que são usadas (MILLS; HALL; BERRY, 2017; MOZAFFARIAN et al., 2006; SATCHITHANANDAM et al., 2004). As maiores fontes dessas gorduras são produtos animais, óleos e gorduras de uso culinário, alimentos assados, bolos, biscoitos doces e salgados e margarina (DHAKA et al., 2011; MOZAFFARIAN et al., 2006; NG et al., 2018; PEREIRA et al., 2014). Tal processo, no entanto, tem como efeito indesejável a isomerização de ácidos graxos insaturados, que passam da sua forma nativa *cis* para uma configuração *trans*, mais estável, graças à assimetria dessas moléculas (ALFIERI et al., 2017; MARTIN et al., 2007).

Apesar de seus aspectos interessantes para a indústria, as gorduras *trans* produzidas pela hidrogenação parcial vêm sendo associadas a diversos danos à saúde e maior mortalidade, causando efeitos adversos sobre concentrações de lipídios no sangue, inflamação, estresse oxidativo, função endotelial, peso corporal, sensibilidade à insulina e câncer (GEBAUER; PSOTA; KRIS-ETHERTON, 2007). Dietas com gordura *trans* afetam níveis de lipídios séricos, aumentando níveis de LDL e triglicerídeos, reduzindo níveis de HDL e aumentando a razão colesterol total/HDL. Assim, o seu consumo aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ALFIERI et al., 2017; MOZAFFARIAN et al., 2006; NG et al., 2018). A ingestão de gorduras parcialmente hidrogenadas também leva ao aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6 e proteína C-reativa (LOPEZ-GARCIA et al., 2005; MOZAFFARIAN et al., 2004, 2006), promovendo resposta inflamatória sistêmica, importante na patogênese de doença cardiovascular, diabetes e DHGNA. Diversos estudos sugerem, ainda, que o consumo de gorduras *trans* causa disfunção endotelial (MOZAFFARIAN et al., 2006).

Como resultado, muitos países já vêm implementando restrições ao seu consumo e distribuição, e a própria indústria de alimentos já reduziu voluntariamente seu uso (ALFIERI et al., 2017; ASCHERIO, 2006; ASCHERIO; WILLETT, 1997; GINTER; SIMKO, 2016; MARTIN et al., 2007; WILCZEK; OLSZEWSKI; KRUPIENICZ, 2017). No Brasil, foi sancionado em maio de 2017 o Projeto de Lei do Senado nº 478, que determinou que os alimentos não poderiam conter gorduras *trans* e estabeleceu o incentivo às pesquisas com o intuito de formulação de gorduras para a substituição das gorduras *trans* e gorduras saturadas dos alimentos. Adicionalmente, em dezembro de 2019, foi publicada pela Anvisa a Resolução da Diretoria Colegiada 332/2019 (RDC 332) a qual estabelece normas sobre o uso de AGT, no Brasil, a serem implantadas em três fases, iniciando com o estabelecimento de limites de 2% de AGT para a produção de alimentos pela indústria e por serviços de alimentação e prosseguindo

até o banimento total do seu uso até 2023.

Em reação às restrições ao uso das gorduras *trans*, graças a seus efeitos deletérios, a indústria de alimentos passou a utilizar as chamadas “gorduras interesterificadas”. Esses substitutos para as gorduras *trans* têm sido utilizados em muitos produtos comumente consumidos, como margarinas, alimentos assados, confeitados, biscoitos e outros produtos de panificação (ALFIERI et al., 2017; MILLS; HALL; BERRY, 2017; SANTOS et al., 2013). Essas gorduras conferem aos produtos alimentícios características desejadas pela indústria, incluindo sabor, textura e uma maior validade (MILLS; HALL; BERRY, 2017; SANTOS et al., 2013).

O processo de interesterificação permite modificar a posição do ácido graxo na molécula de triacilglicerol (ALFIERI et al., 2017; SANTOS et al., 2013). As gorduras interesterificadas são obtidas por métodos enzimáticos ou químicos que promovem a incorporação de um ácido graxo específico no suporte de glicerol, ou o rearranjo dos ácidos graxos nativos nas diferentes posições da molécula de triacilglicerol (ALFIERI et al., 2017; MILLS; HALL; BERRY, 2017). Na interesterificação química, são produzidos rearranjos aleatórios, com um tempo de reação mais curto; já a enzimática utiliza lipases comerciais e é conduzida em temperaturas amenas, produzindo menos efeitos colaterais deletérios e subprodutos, sendo regioespecífica (ALFIERI et al., 2017; MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Diferentemente da hidrogenação parcial – que cria gorduras *trans* – a interesterificação não altera o grau de saturação/insaturação ou o estado isomérico dos ácidos graxos, modificando apenas a posição de grupos acila nas moléculas de triacilglicerol (ALFIERI et al., 2017). Tal processo, apesar de manter o perfil de ácidos graxos, praticamente, inalterado, altera as propriedades físicas dos triacilgliceróis, como o seu ponto de fusão, e, conseqüentemente, a digestão, absorção e metabolização da molécula como um todo em nosso organismo (ALFIERI et al., 2017; SANTOS et al., 2013). Sendo assim, o uso da interesterificação é causa de preocupação na área de saúde, visto que, além de gerar misturas de triacilgliceróis completamente novas, os efeitos de seu consumo sobre o organismo ainda vêm sendo investigados, apresentando alguns resultados controversos (ALFIERI et al., 2017; SANTOS et al., 2013).

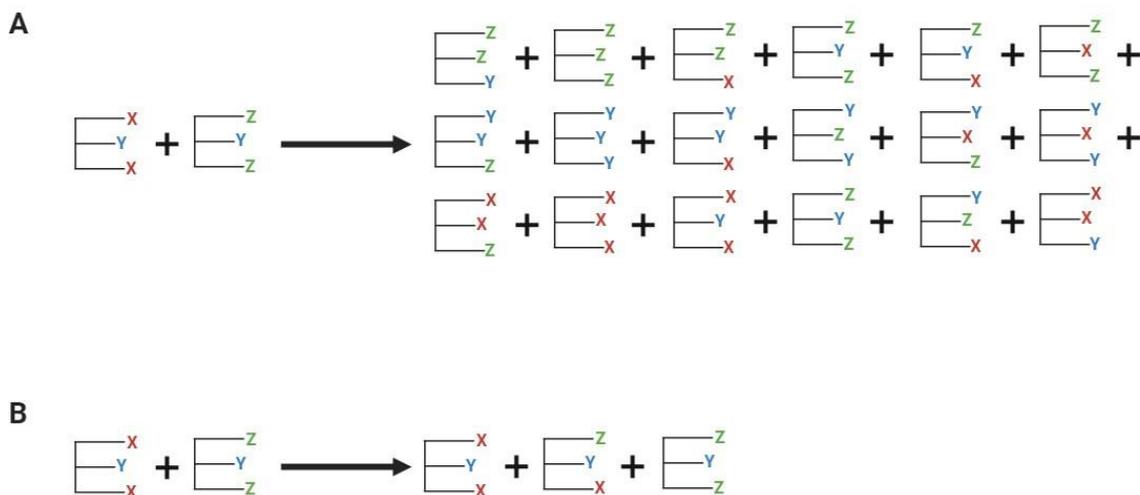


Figura 4. Interesterificação: esquema representando as moléculas de triacilglicerol contendo três ácidos graxos. Os ácidos graxos são representados pelas letras X, Y e Z. (A) Interesterificação química, com rearranjos aleatórios dos grupos acila. (B) Interesterificação enzimática, com rearranjos regioespecíficos dos grupos acila. Adaptado de (MILLS; HALL; BERRY, 2017).

Alguns estudos concluíram que o consumo de gordura interesterificada teve influência positiva nos perfis de lipoproteínas plasmáticas, na redução de concentração de triacilglicerol no plasma e na diminuição de lipemia pós-prandial, o que pode ser explicado por diferenças na digestão e absorção das gorduras (ALFIERI et al., 2017). Por isso, foi indicado, inicialmente, que, em condições pós-prandiais, refeições ricas em gorduras interesterificadas poderiam reduzir o risco de doenças cardiovasculares (ALFIERI et al., 2017). Um estudo clínico concluiu que a inclusão de gorduras interesterificadas ricas em ácidos palmítico e esteárico não teve efeitos adversos sobre a resistência à insulina, importante fator na fisiopatogênese da DHGNA (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; NG et al., 2018).

Outros trabalhos, no entanto, vêm demonstrando efeitos deletérios do consumo de gorduras interesterificadas. Num estudo realizado com camundongos, foi demonstrado que a ingestão de dietas normolipídicas contendo gordura interesterificada durante a gravidez e a lactação predisps a prole à disfunção mitocondrial hepática, relacionada a alterações no estado de redução-oxidação. Assim, é sugerida uma associação entre o consumo de gordura interesterificada no início da vida e um aumento do risco para o desenvolvimento de doenças crônicas metabólicas na vida adulta (VELASCO et al., 2017). No mesmo estudo, a disfunção mitocondrial hepática foi acompanhada por homeostase prejudicada de glicose e alterações nos perfis plasmático e hepático de lipídios, favorecendo o desenvolvimento de DHGNA e doença cardiovascular (VELASCO et al., 2017).

Outro estudo – este feito com humanos – comparou os efeitos de uma dieta usando óleo de palma sem processamento químico com os efeitos de dietas que usavam gordura parcialmente hidrogenada e gordura interesterificada em alguns parâmetros metabólicos. Ambas as gorduras modificadas alteraram o metabolismo plasmático de lipoproteínas, a glicemia e a distribuição do colesterol entre as lipoproteínas. Além disso, a gordura interesterificada diminuiu a HDL em

relação à gordura saturada natural, além de ter se mostrado deletéria para o metabolismo da glicose (SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007). Um estudo com ratos Wistar também identificou que o consumo de gordura interesterificada – neste caso, o óleo de soja – prejudicou a tolerância à glicose, além de piorar outros parâmetros metabólicos, levando ao aumento de peso corporal e maior expressão hepática de TNF- $\alpha$ , mesmo numa dieta normolipídica (MIYAMOTO et al., 2018).

Também já foi vista uma relação entre a suplementação da dieta de roedores com gordura interesterificada durante a gravidez e a lactação e uma predisposição metabólica aumentada ao desenvolvimento de obesidade pela prole. Quando adulta, a prole apresentou peso corporal e adiposidade aumentados, tendo mais tecido adiposo branco, maiores depósitos de tecido adiposo nas cavidades intra- e extra-abdominais e hipertrofia dos adipócitos, além da inibição da ação anorexígena da insulina, promovendo alterações no controle hipotalâmico da ingestão de alimentos (BISPO et al., 2015; MAGRI et al., 2015).

Adicionalmente, estudos com camundongos nocaute para o receptor de LDL (LDLr) demonstraram que a ingestão de ácidos graxos interesterificados, além de regular, positivamente, diversos fatores de risco para a DHGNA, levou ao aumento do conteúdo de colágeno do fígado, fosforilação da JNK, infiltração de neutrófilos, expansão do tecido adiposo e hipertrofia de adipócitos, fosforilação de IKK, maior conteúdo de TNF- $\alpha$ , além do desenvolvimento de fibrose hepática e esteatohepatite não-alcoólica (LAVRADOR et al., 2019).

As gorduras *trans*, apesar de já terem sido relacionadas a efeitos deletérios sobre a saúde, não tiveram o seu impacto sobre o fígado humano totalmente elucidado, dado que a maioria dos estudos são realizados em camundongos (BERNÁ; ROMERO-GOMEZ, 2020); adicionalmente, mesmo com as evidências atuais, a população continua exposta às gorduras *trans*, que seguem sendo utilizadas em diversos produtos alimentícios, com a ANVISA tendo estendido recentemente o prazo para o seu banimento dos mercados brasileiros (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; MATHIAS, 2021). Além disso, há resultados controversos em relação aos impactos do consumo de gordura interesterificada sobre o organismo e sua aparente relação com a perturbação de parâmetros que agem como fatores de risco para o desenvolvimento da DHGNA. Sendo assim, mais estudos se fazem necessários para esclarecer os efeitos do consumo dessas gorduras no metabolismo hepático (ALFIERI et al., 2017; SANTOS et al., 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, em 2017, foi sancionado, pelo Senado, o Projeto de Lei nº 478, determinando não só que alimentos não poderiam conter AGT, mas também incentivando as pesquisas em busca de formular gorduras para a substituição dos AGT e gorduras saturadas de produtos industrializados. Além disso, em dezembro de 2019, foi publicada pela ANVISA a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 332/2019, que limita o uso de gordura *trans* em alimentos e serviços de alimentação. A norma prevê que essas limitações serão implantadas em etapas, culminando no banimento do uso das gorduras parcialmente hidrogenadas até 2023; no entanto, outras resoluções vêm sendo publicadas, alterando as definições da RDC 332 e estendendo o tempo de venda de produtos contendo esse tipo de gordura, deixando, então, a população exposta ao seu consumo por ainda mais tempo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; MATHIAS, 2021). Contudo, ainda assim, a indústria de alimentos terá que buscar novas alternativas tecnológicas como substitutos das gorduras *trans* nos alimentos e este cenário implicará na maior utilização de gorduras interesterificadas (GI) para o desenvolvimento de produtos alimentícios, mantendo as características organolépticas dos produtos já aceitos pelos consumidores e atendendo as demandas do mercado consumidor. No entanto, embora as GI apresentem características satisfatórias do ponto de vista industrial, ainda são o foco de diversos estudos uma vez que o impacto desse tipo de lipídio nos processos metabólicos e na saúde dos indivíduos ainda não estão totalmente esclarecidos. Nesse contexto, diversos estudos científicos mostram efeitos deletérios associados ao consumo das GI como alteração dos níveis séricos de lipídios, aumento da adiposidade, acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático acarretando em DHGNA, fibrose e, até mesmo, cirrose e hepatocarcinomas.

Contudo, grande parte dos estudos que abordam os efeitos das gorduras quimicamente modificadas - tanto as *trans* quanto as interesterificadas - encontram desafios na heterogeneidade das dietas, bem como na pouca atenção direcionada à fonte dos componentes dietéticos e na falta de padronização de grupos controle, fatores esses que podem comprometer a acurácia e interpretação dos achados dos estudos.

Além disso, a DHGNA, que é uma das principais morbidades associadas ao consumo das gorduras quimicamente modificadas, ainda não teve sua fisiopatogenia totalmente elucidada e continua sendo estudada. Nesse sentido, modelos pré-clínicos representam uma alternativa importante para que se entenda os mecanismos e marcadores moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença hepática, e portanto, ainda são muito utilizados, com roedores - e especialmente camundongos - sendo muito utilizados devido a seus baixos custos.

Sendo assim, é de grande relevância a avaliação sistemática da literatura pré-clínica envolvendo o consumo de gorduras quimicamente modificadas em modelos de roedores a fim de

examinar as características dos ensaios quanto a composição das dietas utilizadas, bem como os efeitos dessas intervenções dietéticas associados à DHGNA nos animais.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar sistematicamente a literatura examinando os efeitos do consumo de gorduras *trans* e interesterificadas sobre o desenvolvimento da DHGNA em ensaios pré-clínicos com roedores.

### 4.2 Objetivos específicos

Avaliar se o consumo dessas gorduras influencia no desenvolvimento de DHGNA (desfecho primário);

Avaliar como as intervenções são realizadas, em termos de desenho experimental e composição das dietas (desfechos secundários):

- Quais modelos de roedores foram utilizados;
- Qual foi o sexo dos modelos de roedores usados nos experimentos;
- Qual foi o período de administração das dietas para os animais;
- Quais gorduras quimicamente modificadas foram avaliadas;
- Qual foi a porcentagem de quilocalorias proveniente de gordura nas dietas;
- Qual foi a porcentagem de quilocalorias proveniente especificamente de gordura quimicamente modificada nas dietas;
- Como foi avaliada a DHGNA;
- Se foram realizadas outras avaliações que poderiam sugerir DHGNA.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Registro de protocolo

Os métodos deste estudo foram previamente especificados no protocolo do estudo, o qual foi registrado no Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas (PROSPERO), banco de dados de revisões sistemáticas, sob o código CRD42020212189 e título: “*Chemically modified lipids in the development of non-alcoholic fatty liver disease in preclinical rodent models: A systematic review*”, traduzida para o português como “Lipídios quimicamente modificados no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não-alcoólica em modelos pré-clínicos de roedores: uma revisão sistemática” (Apêndice A). O protocolo foi publicado no dia 30 de novembro de 2020.

### 5.2 Busca de artigos científicos em base de dados

Em dezembro de 2020, a busca bibliográfica foi realizada de modo sistemático na base de dados *MEDLINE*, para identificação de estudos pré-clínicos empregando roedores (ratos, camundongos e hamsters) e avaliando o efeito de intervenções dietéticas com lipídios quimicamente modificados no desenvolvimento de DHGNA. A busca foi definida de acordo com o anagrama “PICO”, que é uma estratégia que se refere a “População”, “Intervenção”, “Comparação” e “Desfechos”. Os termos usados na busca estão descritos na Tabela 1. Foram impostas restrições de idioma, data e tipo de publicação. Posteriormente, listas de referências dos artigos identificados, livros recuperados, revisões e “artigos similares” sugeridos pelos bancos de dados foram pesquisados manualmente em busca de estudos elegíveis adicionais não recuperados por nossa pesquisa, com base em seus títulos. Essa estratégia adicional foi usada de maneira complementar ao final da pesquisa, a fim de achar trabalhos específicos possivelmente não incluídos na busca.

Tabela 1. Termos usados na busca de artigos no banco de dados *MEDLINE*.

Componente	Termos
População	"Mice"[MeSH] OR "mice"[tiab] OR "mouse"[tiab] OR "Rats"[MeSH] OR "rat"[tiab] OR "rat" [tiab] OR "Cricetulus"[MeSH] OR "hamster*"[tiab]) NOT ("animals, genetically modified"[MeSH] OR "mice,

	transgenic"[MeSH] OR "rats, transgenic"[MeSH]
Intervenção	"dietary fats"[MeSH] OR "fatty acids"[MeSH] OR "interesterified" [tiab] OR "inter-esterified" [tiab] OR "trans fat*" [tiab] OR "trans-fat*" [tiab] OR "Trans Fatty Acids"[Mesh] OR "Trans Fatty Acids/adverse effects"[Mesh]
Desfechos	"Fatty Liver"[MeSH] OR "Fatty Liver"[tiab] OR "non alcoholic fatty liver disease"[MeSH] OR "non alcoholic fatty liver disease"[tiab] OR "Nonalcoholic Fatty Liver Disease"[tiab] OR "non-alcoholic" [tiab] OR "NAFLD"[tiab] OR "steato*" [tiab] OR "nonalcoholic steato*" [tiab] OR "NASH" [tiab]) NOT ("Fatty Liver, Alcoholic"[Mesh] OR "Liver Diseases, Alcoholic"[Mesh] OR "Reye Syndrome"[MeSH])
Restrições	1993:2020 [dp] NOT (Editorial [pt] OR Review [pt] OR Comment [pt]) AND (English[la]) NOT ("methionine"[tiab] OR "choline" [tiab])

As categorias foram unidas umas às outras com uso do operador booleano “AND”, conector utilizado a fim de combinar as especificações de cada categoria. As aspas foram usadas para que apenas os termos exatos entre elas fossem retornados na busca. Os asteriscos (\*) foram usados como termos de truncamento, para que fossem buscadas palavras com aquele radical, mas terminações diferentes. O operador booleano “OR” foi usado para procurar por diferentes termos dentro de cada categoria. O operador booleano “NOT” foi usado para excluir determinados itens da busca. Entre colchetes, foram usados “tiab” (“*title and abstract*”, para buscar os termos nos títulos e resumos dos artigos) e “MeSH” (“*Medical Subheadings*”, sistema de indexação do *PubMed/MEDLINE*).

### 5.3 Seleção de estudos

Os estudos foram incluídos caso tivessem empregado:

- Animais/população: roedores (ratos, camundongos e hamsters);
- Desenho experimental: estudos de indução/desenvolvimento de DHGNA
- Intervenção: intervenções dietéticas usando lipídios quimicamente modificados, com e sem a adição de sacarose;
  - Controle/comparador: roedores (ratos, camundongos e hamsters) recebendo ração padrão normolipídica (controle negativo) e dieta hiperlipídica sem gorduras quimicamente modificadas (controle positivo);
  - Desfecho: o desfecho primário foi a esteatose (histologia, conteúdo de triglicerídeos, outros).

Os estudos foram excluídos caso não tivessem envolvido o uso de modelos animais com

roedores, utilizados modelos transgênicos, induzido o desenvolvimento de DHGNA sem o emprego de intervenções dietéticas ou controles adequados. De modo similar, estudos publicados em idiomas diferentes da Língua Inglesa ou anteriores ao ano de 1993 (ano da publicação mais recente do Instituto Americano de Nutrição (AIN) estabelecendo a composição padrão de uma dieta purificada para roedores experimentais (AIN-93)) foram também excluídos.

A seleção de estudos foi realizada em duas fases de acordo com critérios de elegibilidade com o auxílio da plataforma online *Ragic!*. A primeira fase foi baseada na leitura do título e do resumo, enquanto a segunda foi baseada na leitura dos textos completos. A triagem em ambas as fases foi conduzida por dois revisores independentes; em caso de discrepâncias, era realizada uma discussão para se chegar a um consenso. Informações detalhadas dos critérios de exclusão aplicados em cada fase são apresentados no Apêndice B.

#### 5.4 Extração de dados

A extração de dados foi realizada por dois revisores de forma independente. Discrepâncias foram resolvidas por meio de discussões e consenso.

Foram coletadas informações sobre os detalhes bibliográficos dos estudos incluídos, como título, autores, ano de publicação e periódico. Em relação ao desenho experimental dos estudos, foram extraídas informações sobre o modelo animal e a intervenção dietética (controle normolipídico, controle hiperlipídico e dieta com gordura quimicamente modificada) utilizados. Quanto ao modelo animal, foram coletadas informações sobre qual roedor foi usado (espécie e linhagem), sexo, idade (em semanas, levando em consideração a idade mais baixa informada no estudo, em caso de variação de idade entre os animais) ao início da dieta e período de intervenção dietética (em semanas, sendo considerado o período máximo de intervenção dietética informado no estudo). Quanto às intervenções dietéticas, foram extraídas as seguintes informações: a porcentagem de quilocalorias (kcal) proveniente de gordura na dieta; o percentual de gramas proveniente de sacarose; a fonte comercial da dieta; o código do produto, se disponível. Especificamente em relação à dieta com gordura quimicamente modificada, foram coletados dados adicionais: o tipo de gordura quimicamente modificada empregada na intervenção dietética; o método de modificação química utilizado; fonte lipídica que foi quimicamente modificada; a porcentagem de gordura quimicamente modificada dentre o total de gordura da dieta; a porcentagem de quilocalorias proveniente de gordura quimicamente modificada na dieta.

Já em relação às avaliações feitas pelos estudos, os seguintes dados foram extraídos sobre

a esteatose, considerada o desfecho primário: qual o método utilizado para sua avaliação; se a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada induziu esteatose hepática quando comparada à dieta controle normolipídica; se a suplementação com gordura quimicamente modificada piorou a esteatose hepática quando comparada à dieta hiperlipídica sem gordura quimicamente modificada. Quanto aos desfechos secundários, foram extraídas informações sobre inflamação no fígado, níveis plasmáticos/séricos de inflamação, fibrose, enzimas hepáticas e marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante: para todos, foram questionados quais os marcadores avaliados, e se estes foram aumentados pela dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, em comparação aos controles normolipídico e hiperlipídico. Para o desfecho primário (esteatose), além dos dados qualitativos supracitados, foram também extraídos a média e o desvio-padrão. Quando necessário, os dados foram extraídos com o auxílio do software de digitalização (*DigitizeIt*). Além disso, os autores dos estudos foram contatados em caso de falta de dados: eram feitas duas tentativas de contato.

### 5.5 Avaliação de risco de viés

A avaliação de risco de viés foi realizada por dois revisores; em caso de discrepâncias, era realizada uma discussão para se chegar a um consenso.

O risco de viés dos trabalhos incluídos foi analisado de acordo com a ferramenta da SYRCLE (*SYstematic Review Center for Laboratory animal Experimentation*) (HOOIJMANS et al., 2014) para avaliação de risco de viés.

As seguintes informações foram extraídas dos trabalhos incluídos na revisão sistemática para análise do risco de viés: se houve randomização e apresentação de método de randomização; informações de linha de base (sexo, idade, peso corporal, *background* genético); ocultação de alocação; cegamento de pessoal na intervenção; cegamento na avaliação do desfecho; dados de desfecho incompletos; relatório seletivo de desfechos; outras fontes de viés: fonte de carboidrato da dieta; potencial conflito de interesses devido à fonte de financiamento.

Os tipos de vieses, o seu domínio, sua descrição e o julgamento adotado para cada um deles na revisão estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de risco de viés usada na revisão, adaptada a partir da ferramenta da SYRCLE

Tipo de viés	Domínio	Descrição	Julgamento
Viés de seleção	Geração de sequência aleatória	Detalhamento do artigo sobre a geração de sequência aleatória para separação dos grupos, e quais os métodos usados.	Houve geração de sequência aleatória? Quais os métodos usados?

Viés de seleção	Característica de linha de base	Descrição, pelo estudo, das características dos animais ao início da intervenção: sexo, idade, peso corporal e <i>background</i> genético.	Os grupos experimentais e controles eram similares em suas características ao início do experimento? Houve ajuste para fatores de confusão na análise? Qual a variação dessas características?
Viés de seleção	Ocultação de alocação	Descrição do método usado para ocultar a alocação dos animais nos grupos.	A alocação dos animais nos grupos foi ocultada adequadamente? Qual foi o método usado?
Viés de performance	Cegamento de pessoal	Descrição das medidas usadas para cegar os pesquisadores e cuidadores dos animais, para que não soubessem qual intervenção cada animal receberia.	Os pesquisadores e cuidadores foram cegados quanto a qual intervenção cada animal recebeu no experimento?
Viés de detecção	Cegamento de avaliação do desfecho	Descrição das medidas usadas para ocultar dos pesquisadores, no momento da avaliação do desfecho, quais animais receberam qual intervenção.	A análise do desfecho foi realizada de maneira cega? De que forma?
Viés de atrito	Dados de desfecho incompletos	Descrição da completude dos dados dos desfechos, incluindo possíveis atritos e exclusões das análises. Quais foram os números de animais usados em cada intervenção, em relação ao total de animais? Se ocorridos, foram dadas razões para atritos e exclusões?	Os dados dos desfechos foram relatados de maneira incompleta?
Viés de relato	Relatório seletivo de desfechos	Houve relato seletivo de desfechos?	Os desfechos foram relatados de maneira confiável? Os dados foram mostrados de forma quantificada?
Outro	Outras fontes de viés	Os estudos informaram a fonte de carboidrato das dietas?	Os estudos informaram a fonte de carboidrato usada nas diferentes dietas? Houve uso de sacarose, que pode influenciar no desenvolvimento de DHGNA?
Outro	Financiamento	Descrição das fontes de financiamento do estudo.	O estudo informou a fonte de financiamento? Esta fonte era, de alguma forma, conectada à indústria de alimentos?

Adaptado de HOOIJMANS et al., 2014.

## 5.6 Análise de dados

Foi realizada uma revisão sistemática qualitativa, com os dados sintetizados em tabelas com características e desfechos relevantes dos estudos incluídos. Estas tabelas resumem as características dos desenhos experimentais dos artigos, como características dos roedores, detalhes da composição das dietas utilizadas, período de ingestão e medidas dos desfechos. Devido à heterogeneidade dos estudos incluídos, não foi possível realizar uma meta-análise.

Foram, ainda, coletados dados quantitativos sobre o peso corporal, esteatose hepática avaliada por histologia e esteatose hepática examinada por meio da dosagem de triglicerídeos hepáticos. Foram registradas informações sobre a média e desvio-padrão.

As diferenças entre grupos foram padronizadas por meio da razão entre médias (ReM). Essa abordagem permite colocar na mesma escala todos os estudos, mesmo que tenham empregado unidades de mensuração diferentes. A premissa é que todas as variáveis tenham sempre valores positivos. De acordo com Friedrich e colaboradores (2011), a ReM tem uma interpretação bastante fácil: valores acima de 1.0 indicam que a média do grupo intervenção é maior que a média do grupo controle. Ao contrário, uma  $ReM < 1.0$  significa que a média do grupo intervenção é menor que a média do grupo controle. Valores de ReM iguais a 1.0 denotam que ambos os grupos têm uma média de igual magnitude. Os intervalos de confiança de 95% e os valores de P (bi-caudais) foram calculados como descrito por Friedrich et al. De modo específico, os valores de P (bicaudais) foram calculados por um teste Z, dividindo a ReM pelo seu respectivo erro-padrão.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resultados da busca

A partir da busca realizada com os descritores em inglês na base de dados eletrônica *MEDLINE*, foi recuperado um total de 2132 artigos. Após a leitura dos resumos na primeira fase de seleção, 1042 artigos foram excluídos, com 1089 sendo considerados elegíveis de acordo com os critérios previamente estabelecidos. As principais razões de exclusão dos estudos foram a ausência de intervenção dietética enriquecida em gordura (23,6% dos artigos excluídos), o uso de modelos animais transgênicos (21,4%), estudos *in vitro* (15,26%) e indução química ou farmacológica da DHGNA (10,27%). As demais razões para a exclusão dos artigos na primeira fase da seleção estão sumarizadas na Figura 5.

Os 1089 estudos selecionados na primeira fase tiveram seu texto completo recuperado e examinado na segunda fase, em que foram selecionados artigos que usassem intervenções dietéticas com gordura quimicamente modificada para induzir DHGNA em roedores. Nesta fase, também foram analisados os textos completos de dois artigos obtidos por uma busca manual complementar e de um estudo listado nas referências dos estudos incluídos, totalizando 1092 artigos avaliados nesta etapa. Dentre esses, 1086 publicações foram excluídas após a sua leitura completa. As razões mais frequentes na exclusão dos estudos foram a utilização de uma dieta sem gordura quimicamente modificada (61,88%) e a apresentação de informações insuficientes sobre a dieta usada (20,26%). As demais razões para a exclusão dos artigos na segunda fase da seleção estão sumarizadas na Figura 5.

Ao final da segunda fase de seleção, 6 publicações foram incluídas para a análise final; destas, 4 foram recuperadas a partir da seleção, 1 a partir da busca manual e 1 a partir das referências dos estudos incluídos. Todas as etapas da seleção de artigos e as razões para a sua exclusão em cada uma das fases estão sumarizadas na Figura 5.

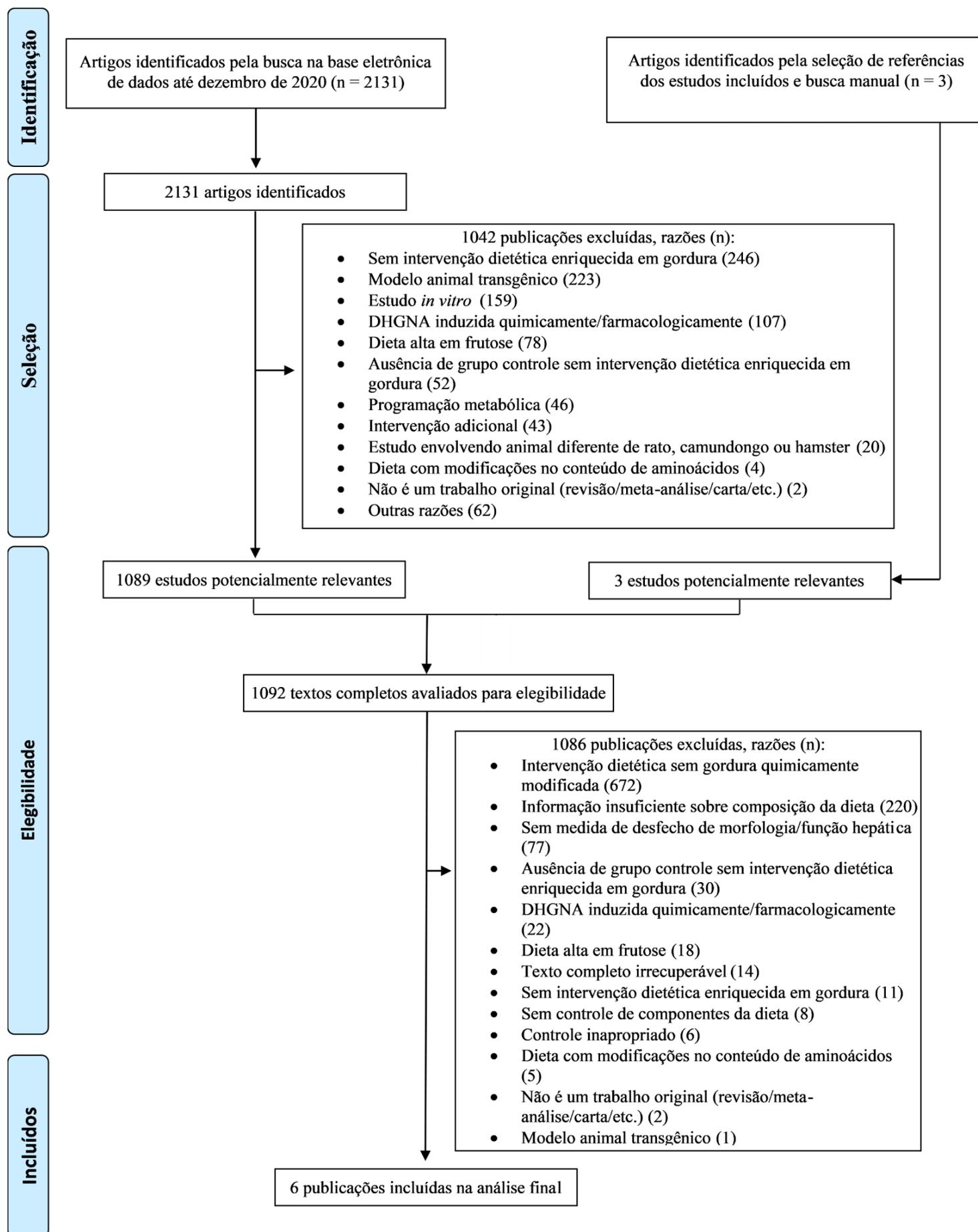


Figura 5. Fluxograma com a busca e seleção de estudos na revisão sistemática. Busca realizada em dezembro de 2020.

## 6.2 Características dos estudos

### 6.2.1 Animais utilizados

Foram incluídos na análise cinco estudos com camundongos e apenas um estudo com ratos, os quais foram publicados entre os anos de 2009 e 2020. Em relação ao *background* genético, dos cinco artigos que usaram camundongos, três utilizaram animais da linhagem C57Bl6, um empregou a linhagem Swiss, e outro a linhagem AKR/J de camundongos. O único estudo incluído com ratos utilizou animais da linhagem Wistar. Não foi encontrado nenhum artigo com hamster que preenchesse todos os critérios de inclusão estabelecidos previamente. Em relação ao sexo, apenas um estudo com camundongos utilizou animais fêmeas; o restante dos trabalhos, incluindo o único com ratos, usou apenas animais machos. Em relação à idade dos animais, quatro trabalhos incluídos utilizaram animais entre 8 e 10 semanas de idade ao início da intervenção dietética, com uma média de 9 semanas. No entanto, dois estudos não relataram a idade dos animais de forma clara. As informações sobre os animais usados nos estudos são mostradas na Tabela 3.

### 6.2.2 Período da dieta

O período da dieta em semanas empregado nos estudos incluídos variou de 4 a 24 semanas, com uma média de 12 semanas (Tabela 3).

### 6.2.3 Gorduras quimicamente modificadas avaliadas

Apenas um estudo avaliou a incorporação de gordura interesterificada; enquanto outros quatro examinaram os efeitos da gordura *trans*, e um investigou o efeito de outro tipo de gordura quimicamente modificada. Três estudos forneceram informações a respeito do método de modificação da gordura, com dois deles utilizando um processo químico e um deles o encurtamento. A fonte de gordura quimicamente modificada também variou entre os estudos, com 2 deles usando óleo de palma, um usando óleo de canola e um usando óleo de coco. Além disso, um dos estudos (Dhibi et al) avaliou duas intervenções dietéticas: uma delas com óleo de soja oxidado e outra com

margarina, esta segunda não tendo informado a fonte da gordura, assim como um outro estudo. A extração dos dados a respeito dessas duas intervenções dietéticas avaliadas por Dhibi et al foi realizada de modo independente (Tabela 3).

#### 6.2.4 Porcentagens de gordura na intervenção hiperlipídica com gordura quimicamente modificada

Todos os estudos relataram a incorporação de gordura quimicamente modificada a uma dieta hiperlipídica. A porcentagem de energia, expressa em kcal, proveniente de gordura na dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada variou entre os estudos, de 41,67 a 63,60%, tendo uma média de 49,56%. A porcentagem de gordura quimicamente modificada dentre a gordura total da dieta também apresentou variação entre os trabalhos, de 1,23 a 100%, com uma média de 40,36%. A porcentagem de quilocalorias proveniente de gordura quimicamente modificada na dieta também variou, de 2,56% a 45%, com uma média de 20,69% (Tabela 3).

Tabela 3. Informações básicas sobre o desenho experimental dos estudos.

Autor, ano	Modelo animal	Linhagem	Sexo	Idade (semanas)	Período da dieta (semanas)	Gordura quimicamente modificada			Dieta hiperlipídica GQM				Histologia hepática	Triglicerídeos hepáticos
						Tipo	Método	Fonte	% kcal lipídios	% GQM total lipídios	% kcal GQM dieta	% g sacarose		
Miyamoto, 2020	Camundongo	Swiss	Macho	NR	8	GI.	Química	Óleo de palma	45,00	100,00	45,00	20,10	Sim	Sim
Wang, 2017	Camundongo	C57Bl6	Macho	8	16	Outro	Incerto	Óleo de coco	60,00	51,40	31,00	9,00	Sim	Sim
Zhao, 2016	Camundongo	C57Bl6	Macho	10	20	<i>Trans</i>	Encurtamento	Óleo de palma	50,00	NR	NR	18,32	Sim	Não
Dhibi, 2011 (1)	Rato	Wistar	Macho	NR	4	<i>Trans</i>	Química	Óleo de soja	41,67	1,23	2,56	NR	Sim	Não
Dhibi, 2011 (2)	Rato	Wistar	Macho	NR	4	<i>Trans</i>	Química	Incerto	41,67	2,40	4,87	NR	Sim	Não
Obara, 2010	Camundongo	C57Bl6	Fêmea	8	24	<i>Trans</i>	Incerto	Óleo de canola	63,60	28,50	NR	NR	Sim	Sim
Koppe, 2009	Camundongo	AKR/J	Macho	9	8	<i>Trans</i>	Incerto	Incerto	45,00	58,60	20,00	NR	Não	Sim

GI: Gordura Interesterificada. GQM: Gordura Quimicamente Modificada. kcal: quilocalorias. NR: Não Relatado. O artigo *Dhibi et al., 2011* foi dividido em dois itens devido aos grupos usados em seu experimento: o item (1) é referente ao grupo que recebeu uma dieta hiperlipídica com óleo de soja oxidado. O item (2) é referente ao grupo que recebeu uma dieta com margarina.

### 6.2.5 Controles empregados nos estudos

Todos os estudos incluídos na avaliação utilizaram controles negativo (dieta normolipídica) e positivo (dieta hiperlipídica sem gordura quimicamente modificada), destacados nos critérios de elegibilidade. Uma grande variação na porcentagem de energia proveniente de gordura foi observada na dieta controle normolipídica, com estudos utilizando dietas controle com 9,47% a 25% de Kcal proveniente de gordura. Já o controle hiperlipídico variou de 41,67% a 63,60% de Kcal proveniente de gordura, a mesma variação encontrada para as dietas hiperlipídicas com gordura quimicamente modificada. Informações detalhadas são apresentadas na Tabela 4.

### 6.2.6 Intervenção normolipídica com gordura quimicamente modificada

Apenas três dos seis trabalhos adicionaram gordura quimicamente modificada a uma dieta normolipídica. Dentre esses estudos, a porcentagem de kcal proveniente de gordura nesse tipo de dieta variou entre 9,47 e 25%, as mesmas quantidades mínima e máxima em relação às dietas controle normolipídicas. As porcentagens de kcal provenientes de gordura em todas as dietas empregadas nos estudos são mostradas na Tabela 4, incluindo a informação sobre a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada para fins de comparação.

### 6.2.7 Sacarose nas dietas

A percentual do peso total da dieta proveniente da sacarose variou entre os grupos e estudos. Na dieta controle normolipídica, esse dado não foi relatado pela maioria dos estudos; dos seis, apenas dois informaram este dado, sendo 5 e 6,8%. Nos grupos de dieta normolipídica com gordura quimicamente modificada, a porcentagem de peso da dieta proveniente de sacarose foi relatada apenas por dois dos três estudos, variando entre 5 e 19,65%. Nas dietas hiperlipídicas com gordura quimicamente modificada, essa informação foi relatada apenas em três dos seis estudos, variando entre 9 e 20,10%. As porcentagens de gramas provenientes de sacarose nas dietas dos estudos são mostradas na Tabela 4, incluindo a informação sobre a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada para fins de comparação.

### 6.2.8 Avaliação de esteatose hepática

Cinco dos seis estudos incluídos avaliaram a esteatose hepática (desfecho primário) por histologia; 4 dos 6 estudos avaliaram a esteatose por conteúdo de triglicérides hepáticos; dentre esses estudos, 3 utilizaram ambas as técnicas. As informações básicas sobre o desenho experimental de cada estudo são mostradas na Tabela 3.

Tabela 4. Porcentagem de quilocalorias proveniente de lipídios e de gramas de sacarose das dietas utilizadas nos estudos analisados.

Autor, ano	Controle normolipídica		Normolipídica GQM		Controle hiperlipídica		Hiperlipídica GQM	
	% kcal gordura	% g sacarose	% kcal gordura	% g sacarose	% kcal gordura	% g sacarose	% kcal gordura	% g sacarose
Miyamoto, 2020	9,47	5,00	9,47	5,00	45,00	20,10	45,00	20,10
Wang, 2017	10,00	6,80	NA	NA	60,00	9,00	60,00	9,00
Zhao, 2016	25,00	NR	25	19,65	50,00	NR	50,00	18,32
Dhibi, 2011	10,22	NR	NA	NA	41,67	NR	41,67	NR
Obara, 2010	11,80	NR	11,80	NR	63,60	NR	63,60	NR
Koppe, 2009	10,00	NR	NA	NA	45,00	NR	45,00	NR

GQM: Gordura Quimicamente Modificada. NA: Não se Aplica. NR: Não Relatado. Apesar das duas dietas de Dhibi et al. utilizarem gorduras quimicamente modificadas diferentes, a sua composição de macronutrientes era similar.

## 6.3 Desfechos dos estudos

### 6.3.1 Desfecho primário

Em relação ao desfecho primário, a esteatose, foi avaliado se a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada causou mais esteatose que as dietas controle normolipídica - o que se confirmou para todos os seis estudos incluídos - e hiperlipídica; neste segundo caso, apenas dois estudos confirmaram a pergunta. Para outros três estudos, a dieta hiperlipídica com a gordura quimicamente modificada adicionada não causou mais esteatose que o controle positivo, e para outro - neste caso, as duas intervenções dietéticas realizadas por Dhibi e colaboradores -, esta comparação foi incerta, dado que o trabalho não demonstra os resultados de histologia quantitativamente, apenas descrevendo as diferenças no tecido hepático. As informações sobre os efeitos da dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada sobre a esteatose relatadas pelos estudos, em comparação aos grupos controle normolipídico e hiperlipídico, são mostradas na Tabela 5.

Quando possível, dados numéricos (tamanho dos grupos experimentais, média e desvio-padrão) dos estudos incluídos na revisão foram coletados, relativos ao peso corporal dos animais usados nos experimentos e à esteatose hepática dos roedores frente à intervenção dietética, com ambas as técnicas de histologia e de triglicerídeos hepáticos. Então, calculou-se o tamanho do efeito (*effect size*) e o valor de P para a comparação entre os grupos (controle normolipídico e controle hiperlipídico; controle normolipídico e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada; controle hiperlipídico e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada).

Os dados de esteatose hepática avaliados por histologia foram coletados de dois estudos. O número de animais experimentais usados em cada grupo foi informado apenas por dois trabalhos, que utilizaram 4 e 6 animais. O estudo de Zhao e colaboradores não informou o tamanho amostral impossibilitando a comparação com os demais estudos. Ambos os estudos utilizaram escore de atividade de DHGNA (*NAFLD activity score*, NAS) (KLEINER et al., 2005) como unidade de medida. Para a esteatose medida por histologia, o tamanho do efeito na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta controle hiperlipídica variou entre 5,06 e 20,46 nos estudos. Já na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, o tamanho do efeito variou entre 3,55 e 21,65. Por fim, na comparação entre os grupos de dieta controle hiperlipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, nenhum efeito estatisticamente significativo foi observado na inclusão da gordura quimicamente modificada. Os dados de esteatose hepática medidos por triglicerídeos foram coletados de quatro estudos. O número de animais experimentais usados em cada grupo - controle normolipídico, controle hiperlipídico e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada - foi o mesmo dentro de três de quatro estudos, variando entre 4 e 6 animais, com exceção de Miyamoto e colaboradores, estudo em que foram usados 9 animais no grupo controle normolipídico, 8 no grupo

controle hiperlipídico e 10 no grupo de dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada. As medidas de triglicerídeos hepáticos variaram entre os estudos: Miyamoto e colaboradores utilizaram miligrama por grama (mg/g); Wang et al. utilizou micrograma por grama de proteína (µg/g); Obara e colaboradores utilizaram micromol por grama de tecido (µmol/g); Koppe e colaboradores utilizaram micrograma por miligrama de proteína (µg/mg). Para a esteatose medida por triglicerídeos, o tamanho do efeito variou entre 1,30 e 5,09 nos estudos, na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta controle hiperlipídica. Desse modo, similar à análise morfológica, a investigação de triglicerídeos hepáticos indicou um aumento de acúmulo de gordura no fígado com a ingestão de dieta hiperlipídica. Curiosamente, a magnitude do efeito da dieta não foi dependente do período da dieta ou da porcentagem de gordura da dieta hiperlipídica.

Já na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, o tamanho do efeito variou entre 1,68 e 4,19. Novamente, a magnitude do efeito não foi dependente do período ou do percentual de gordura na dieta. Por fim, na comparação entre os grupos de dieta controle hiperlipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, a variação de tamanho do efeito foi de 0,82 a 3,10; neste caso, três dos quatro resultados foram estatisticamente significativos, sendo o maior *effect size* observado com o emprego de gordura *trans* e o maior período de dieta (24 semanas).

Dos quatro estudos cujos dados numéricos sobre a esteatose foram coletados, dois deles utilizaram ambos os métodos de avaliação da esteatose hepática (histologia e conteúdo de triglicerídeos hepáticos), enquanto os outros dois estudos avaliaram a esteatose apenas via quantificação de triglicerídeos hepáticos.

Em relação aos estudos que utilizaram ambas as técnicas, um deles encontrou diferenças entre os resultados dependendo do método de avaliação, quando o objetivo era analisar os efeitos da gordura quimicamente modificada. Ao comparar o grupo controle hiperlipídico com o que recebeu a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, só foi encontrado um resultado significativo (e com maior tamanho de efeito) quando a quantificação de triglicerídeos hepáticos foi utilizada para confirmar a esteatose hepática, o que não aconteceu ao se utilizar a histologia. Já ao analisar o efeito da dieta hiperlipídica (comparando o grupo controle normolipídico com o controle hiperlipídico ou com a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada), o método de avaliação da esteatose não influenciou o efeito observado.

Tabela 5. Efeitos da dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada sobre a esteatose nos estudos incluídos.

<b>Autor, ano</b>	<b>Causou mais esteatose que dieta controle normolipídica?</b>	<b>Causou mais esteatose que dieta controle hiperlipídica?</b>
Miyamoto, 2020	Sim	Sim
Wang, 2017	Sim	Não
Zhao, 2016	Sim	Sim

Dhibi, 2011 (1)	Sim	Incerto
Dhibi, 2011 (2)	Sim	Incerto
Obara, 2010	Sim	Sim
Koppe, 2009	Sim	Não

GQM: Gordura Quimicamente Modificada. O artigo Dhibi et al., 2011 foi dividido em dois itens devido aos grupos usados em seu experimento: o item (1) é referente ao grupo que recebeu uma dieta hiperlipídica com óleo de soja oxidado. O item (2) é referente ao grupo que recebeu uma dieta com margarina.

### 6.3.2 Desfechos secundários

Uma vez que o quadro de DHGNA é também caracterizado por aumento de inflamação, fibrose e estresse oxidativo, bem como redução na função hepática, avaliamos quais análises complementares foram realizadas pelos estudos incluídos e os resultados reportados.

A inflamação hepática foi o desfecho secundário mais avaliado, sendo analisada por quatro dos seis trabalhos, por meio de diferentes métodos, incluindo histologia e análise de moléculas como IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS (óxido nítrico sintase indutível) e SOCS1 (supressor da sinalização de citocina 1); 2 estudos analisaram a histologia hepática, e os outros 2, marcadores moleculares. As avaliações histológicas não apresentaram diferenças entre os grupos, ou foram julgadas como inconclusivas. Os dois estudos que avaliaram IL-6 o fizeram através da quantificação de RNA mensageiro (RNAm), e não encontraram diferenças neste parâmetro no grupo com dieta hiperlipídica e gordura quimicamente modificada, em comparação aos controles normolipídico e hiperlipídico. Os estudos que avaliaram TNF- $\alpha$  também fizeram suas análises por quantificação de RNA mensageiro, mas diferiram num dos resultados: apenas um dos estudos detectou níveis mais altos de RNAm de TNF- $\alpha$  na intervenção hiperlipídica quimicamente modificada em comparação à dieta controle normolipídica; já em comparação ao controle hiperlipídico, nenhum dos dois estudos detectou variações nos níveis de RNAm de TNF- $\alpha$ . O único estudo que avaliou IL-10 fez sua análise também por quantificação de RNAm, e também não foram encontradas variações para esta citocina em relação aos grupos controle. Também foram avaliados outros marcadores: iNOS foi avaliado por quantificação de RNAm, e foram detectados níveis mais altos apenas em relação à dieta controle normolipídica. Já IL-1 $\beta$  e SOCS1 foram avaliados por quantificação de RNA mensageiro e proteínas: enquanto os níveis IL-1 $\beta$  foram mais altos em comparação com ambas as dietas controle, SOCS1 tinha níveis aumentados apenas em relação à dieta controle hiperlipídica.

Um dos desfechos secundários, a inflamação a nível plasmático, não foi analisado em nenhum dos estudos.

A fibrose foi avaliada por meio de histologia em metade dos estudos. Em dois dos três estudos, a fibrose aumentou em relação ao grupo controle normolipídico, mas em apenas um desses foi encontrada fibrose aumentada em relação ao grupo controle hiperlipídico. O outro estudo não

encontrou variação em fibrose em relação aos grupos controle.

Enzimas hepáticas também foram analisadas em metade dos estudos; ALT (alanina aminotransferase) foi avaliada em todos os estudos, e AST (aspartato aminotransferase), em apenas 2 deles. Todos os estudos que avaliaram ALT encontraram níveis aumentados em relação às dietas controle normolipídica e hiperlipídica, com exceção de uma das dietas do estudo de Dhibi et al., que utilizou duas intervenções diferentes: uma dieta hiperlipídica com óleo de soja oxidado (na qual não foram detectadas alterações em relação a nenhum dos controles) e uma dieta com margarina (na qual foram detectados níveis aumentados de ALT em relação a ambos os controles). Em relação à AST, ambos os estudos detectaram níveis aumentados da enzima em relação à dieta controle normolipídica; em relação à dieta controle hiperlipídica, novamente houve uma particularidade quanto ao estudo de Dhibi et al.: o aumento de AST em relação a esse controle positivo foi encontrado apenas na dieta com margarina, enquanto essa alteração não ocorreu para a dieta com óleo de soja oxidado.

O estresse oxidativo foi avaliado apenas em dois dos seis estudos, e os marcadores usados nesses trabalhos variaram: um deles analisou catalase, SOD (superóxido dismutase), GPx (glutathione peroxidase), MDA (malondialdeído) e dienos conjugados; outro estudo avaliou o estresse oxidativo por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Todos os estudos encontraram estresse oxidativo aumentado no grupo de dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada em relação aos dois controles (normolipídico e hiperlipídico).

Além disso, analisamos se os estudos relataram que a incorporação de gordura quimicamente modificada alterou o ganho de peso dos animais. Para compararmos a magnitude do efeito, os dados de peso corporal foram coletados de três estudos, os quais reportaram dados completos na publicação: dos seis estudos incluídos, três avaliaram o peso corporal; um deles não realizou esta avaliação; outro só avaliou ganho de peso; um outro estudo avaliou animais que receberam dietas hiperlipídicas com 45% e 60% de lipídios provenientes de gordura, mas não ficou claro qual das dietas foi utilizada para se analisar o peso corporal. O número de animais experimentais usados em cada grupo - controle normolipídico, controle hiperlipídico e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada - foi o mesmo dentro de cada estudo, variando entre 6 e 8 animais. Para o peso corporal, o tamanho do efeito variou entre 1,30 e 1,75 nos estudos, na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta controle hiperlipídica. Já na comparação entre os grupos de dieta controle normolipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, o tamanho do efeito variou entre 1,68 e 1,99. Por fim, na comparação entre os grupos de dieta controle hiperlipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada, a variação de tamanho do efeito foi de 1,14 a 1,29.

As informações sobre os desfechos secundários avaliados nos estudos são mostradas nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 6. Esteatose hepática.

Autor, ano	Técnica utilizada	Unidade de medida	Controle Normolipídico x Controle Hiperlipídico			Controle Normolipídico x Hiperlipídica com GQM			Controle Hiperlipídico x Hiperlipídica com GQM		
			n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p	n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p	n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p
Miyamoto, 2020	Histologia	NAS	4	20,46 (7,09-59,08)	< 0,001	4	19,23 (6,46-57,22)	< 0,001	4	0,94 (0,70-1,26)	0,68
	Triglicerídeos hepáticos	mg/g	9	1,36 (1,08-1,72)	< 0,01	8	1,68 (1,32-2,13)	< 0,001	10	1,23 (1,00-1,51)	0,046
Wang, 2017	Triglicerídeos hepáticos	µg/g de proteína	6	5,09 (4,33-5,98)	< 0,001	6	4,19 (3,61-4,86)	< 0,001	6	0,82 (0,73-0,93)	< 0,01
Obara, 2010	Histologia	NAS	6	5,06 (1,35-18,96)	0,16	6	3,55 (0,97-12,90)	0,05	6	0,70 (0,43-1,14)	0,15
	Triglicerídeos hepáticos	µmol/g de tecido	6	1,30 (1,03-1,63)	0,028	6	4,02 (3,24-4,99)	< 0,001	6	3,10 (2,80-3,44)	< 0,001
Koppe, 2009	Triglicerídeos hepáticos	µg/mg de proteína	4	2,54 (1,99-3,24)	< 0,001	4	2,52 (2,16-2,95)	< 0,001	4	0,99 (0,82-1,20)	0,95

GQM: Gordura Quimicamente Modificada. NAS: *NAFLD Activity Score*. \*Intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7. Desfechos secundários avaliados nos estudos analisados.

Autor, ano	Inflamação hepática	Avaliação inflamação hepática	Fibrose	Avaliação fibrose	Enzimas hepáticas	Enzimas avaliadas	Estresse oxidativo	Avaliação estresse oxidativo
Miyamoto, 2020	Sim	Histologia	Não	NA	Não	NA	Não	NA
Wang, 2017	Não	NA	Sim	Histologia	Não	NA	Não	NA
Zhao, 2016	Não	NA	Não	NA	Não	NA	Não	NA
Dhibi, 2011	Sim	Histologia	Não	NA	Sim	ALT, AST	Sim	Catalase, SOD, GPx, MDA, dienos conjugados
Obara, 2010	Sim	IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS	Sim	Histologia	Sim	ALT, AST	Sim	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Koppe, 2009	Sim	IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , SOCS1	Sim	Histologia	Sim	ALT	Não	NA

NA: Não se Aplica. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase. GPx: glutatona peroxidase. IL-6: interleucina 6. IL-10: interleucina 10. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta. MDA: Malondialdeído. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. iNOS: óxido nítrico sintase indutível. SOCS1: supressor da sinalização de citocina 1. SOD: superóxido dismutase.

Tabela 8. Peso corporal.

Autor, ano	Controle Normolipídico x Controle Hiperlipídico			Controle Normolipídico x Hiperlipídica com GQM			Controle Hiperlipídico x Hiperlipídica com GQM		
	n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p	n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p	n	Tamanho do efeito (IC 95%)*	Valor de p
Wang, 2017	6	1,75 (1,61-1,90)	< 0,001	6	1,99 (1,86-2,13)	< 0,001	6	1,14 (1,06-1,22)	< 0,001
Zhao, 2016	8	1,51 (1,32-1,72)	< 0,001	8	1,74 (1,54-1,97)	< 0,001	8	1,16 (1,07-1,25)	< 0,001
Obara, 2010	6	1,30 (1,16-1,46)	< 0,001	6	1,68 (1,44-1,95)	< 0,001	6	1,29 (1,09-1,52)	< 0,001

GQM: Gordura Quimicamente Modificada. \*Intervalo de confiança de 95%.

## 6.4 Risco de viés

Os seis artigos incluídos na segunda fase passaram por uma análise de viés, construída a partir da ferramenta da SYRCLE para avaliação de risco de viés. De acordo com a análise, para quatro domínios diferentes pertencentes a três categorias distintas de viés - geração de sequência aleatória (viés de seleção), ocultação de alocação (viés de seleção), cegamento de pessoal (viés de performance) e cegamento de avaliação do desfecho (viés de detecção) - todos os estudos foram classificados como viés incerto. Nenhum dos estudos relatou se foi gerada uma sequência aleatória para alocar os animais usados nos experimentos em grupos, ou se houve cegamento da equipe envolvida no estudo.

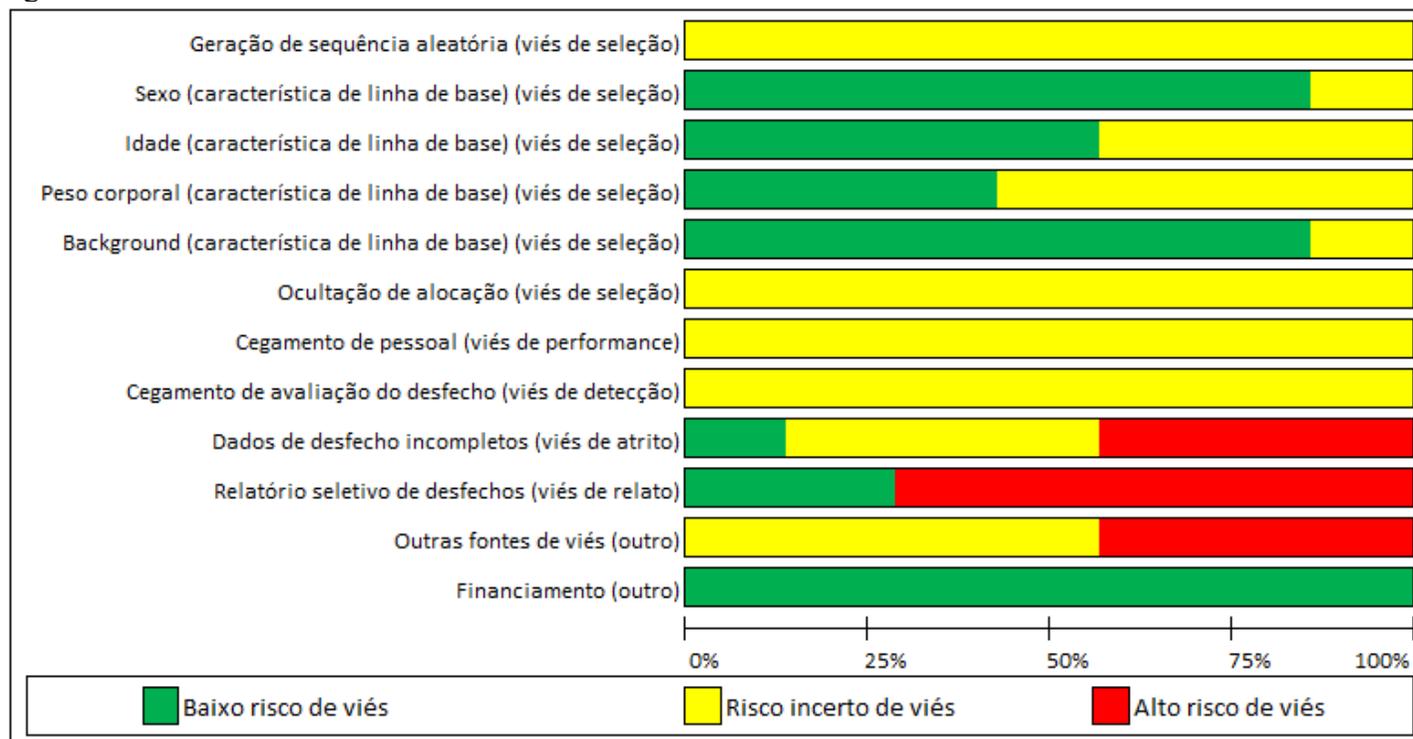
O sexo e *background* genético dos animais usados nos experimentos, classificados como vieses de seleção, foram classificados como baixo risco de viés para a maioria dos estudos, que além de informarem estas características utilizaram animais do mesmo sexo e *background* genético em todos os experimentos, eliminando a chance de alterações nos resultados devido à variação nesses parâmetros. A idade dos animais ao início das intervenções dietéticas, também um viés de seleção, foi relatada em 4 dos 6 estudos. Já o peso corporal, foi relatado apenas em metade dos estudos avaliados; no restante dos trabalhos, este parâmetro não foi informado, sendo classificado como um risco incerto de viés.

Apenas três tipos de viés, pertencentes a três diferentes categorias de viés - dados de desfecho incompletos (viés de atrito), relatório seletivo de desfechos (viés de relato) e outras fontes de viés (outro) - tiveram classificações de alto risco de viés entre os artigos incluídos. Os estudos apresentaram maior risco de viés no domínio de relatório seletivo de desfechos. Apenas o financiamento foi classificado como uma fonte de baixo risco de viés para todos os estudos, visto que nenhum deles recebeu financiamento da indústria de alimentos, e todos indicaram de forma clara a inexistência de conflito de interesses.

Tabela 9. Risco de viés dos estudos avaliados.

Autor, ano	Geração de sequência aleatória	Sexo	Idade	Peso corporal	Background genético	Ocultação de alocação	Cegamento de pessoal	Cegamento de avaliação do desfecho	Dados de desfecho incompletos	Relatório seletivo de desfechos	Outras fontes de viés	Financiamento
Miyamoto, 2020	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto	Baixo	Alto	Baixo
Wang, 2017	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto	Incerto	Incerto	Alto	Alto	Alto	Baixo
Zhao, 2016	Incerto	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo	Incerto	Incerto	Incerto	Alto	Baixo	Alto	Baixo
Dhibi, 2011	Incerto	Baixo	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto	Incerto	Baixo
Obara, 2010	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Incerto	Incerto	Incerto	Baixo	Alto	Incerto	Baixo
Koppe, 2009	Incerto	Baixo	Baixo	Incerto	Baixo	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Alto	Incerto	Baixo

Figura 6. Gráfico de risco de viés dos estudos avaliados.



## 7 DISCUSSÃO

Foram encontrados poucos estudos pré-clínicos sobre os efeitos do consumo de gorduras quimicamente modificadas sobre a DHGNA que se encaixassem em nossos critérios de inclusão; muitos dos trabalhos identificados em nossa busca não usavam uma intervenção dietética enriquecida em gordura ou com gorduras quimicamente modificadas, além de muitos utilizarem modelos animais transgênicos, serem estudos feitos integralmente *in vitro*, induzirem DHGNA química ou farmacologicamente, usarem uma dieta rica em frutose ou não apresentarem informações suficientes sobre a intervenção dietética. Adicionalmente, alguns estudos foram excluídos por não utilizar ambos os controles - positivo (dieta hiperlipídica sem a gordura quimicamente modificada) e negativo (dieta normolipídica sem a gordura quimicamente modificada) -, importantes para definir quais efeitos são provenientes de uma dieta hiperlipídica ou do uso de gorduras quimicamente modificadas. Tal resultado demonstra uma lacuna no conhecimento, pois muitos dos trabalhos identificados incluem fatores de confusão que impossibilitam a avaliação dos efeitos que podem ser exclusivamente atribuídos à inclusão de gordura quimicamente modificada na dieta. Por haver poucos estudos, não se sabe se os trabalhos realizados em modelos de roedores reproduzem os resultados dos estudos clínicos; tal fato dificulta a avaliação de mecanismos moleculares, descoberta de alvos terapêuticos e fármacos para controle e tratamento da doença.

A maioria dos estudos incluídos na busca utilizou intervenções dietéticas com gorduras *trans*. Apenas um dos trabalhos avaliou gorduras interesterificadas na dieta e seu efeito sobre o desenvolvimento e progressão da DHGNA. Este resultado já era esperado devido ao uso das gorduras interesterificadas pela indústria ser mais recente, a fim de substituir as gorduras *trans* em reação às políticas de restrição de sua utilização (ALFIERI et al., 2017). Já tendo sido relacionadas a vários efeitos adversos sobre a saúde, como maiores concentrações de LDL e colesterol total, respostas inflamatórias e acúmulo de gordura hepática e visceral (ALFIERI et al., 2017; ISMAIL et al., 2018; ROGERO; CALDER, 2018; ROSQVIST et al., 2014), as gorduras *trans* passaram a ser proibidas internacionalmente. Essa associação ao desenvolvimento de desordens metabólicas - incluindo a DHGNA - e uma maior mortalidade foi possível graças a numerosos estudos, o que justifica o fato de nossa busca ter mais resultados para esse tipo de gordura.

Os efeitos das gorduras quimicamente modificadas sobre o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não-alcoólica nos estudos avaliados comprovam os achados da literatura até o momento de que as intervenções com gorduras *trans* e interesterificada promovem aumento na esteatose em relação à dieta controle normolipídica. Em geral, os tamanhos dos efeitos deixaram claro que as intervenções dietéticas hiperlipídicas (com e sem gorduras quimicamente modificadas) levaram a diferenças expressivas nos parâmetros de peso corporal e esteatose

hepática (avaliada por histologia e também por triglicerídeos hepáticos) em relação aos animais que receberam dieta controle normolipídica. Quando comparadas umas às outras, no entanto, as dietas hiperlipídicas (com e sem gordura quimicamente modificada) não demonstraram grandes alterações nos parâmetros supracitados. É interessante, então, que estudos futuros analisem intervenções dietéticas feitas com dietas normolipídicas e gordura quimicamente modificada, feitas apenas em três dos seis estudos incluídos em nossa análise.

Além do baixo número de estudos encontrados, uma grande variação nos resultados e razões de expressão foi observada. De fato, os experimentos diferiram, principalmente, na fonte de gordura quimicamente modificada, na porcentagem de energia proveniente de gordura nas dietas (controles normolipídica e hiperlipídica e dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada), na porcentagem de gordura quimicamente modificada dentre o total de gordura da dieta e na porcentagem de energia proveniente de gordura quimicamente modificada nas dietas. Além das diferenças na composição das dietas, os estudos tiveram uma variação importante quanto ao desenho experimental: o período de duração das intervenções dietéticas. Essa grande variabilidade impossibilitou uma meta-análise dos achados.

Em relação ao desfecho primário - a esteatose, analisada por histologia através dos aspectos morfológicos do tecido em cinco dos seis estudos e por triglicerídeos hepáticos em quatro dos seis artigos - todos encontraram um aumento no grupo de dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada em relação à dieta controle normolipídica. No entanto, apenas dois dos seis estudos identificaram aumento dos marcadores de esteatose hepática nos grupos que receberam a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada em comparação ao grupo controle hiperlipídico. Cabe ressaltar que novamente o baixo número de estudos impossibilitou uma análise robusta dos dados.

Algumas inferências interessantes podem ser feitas ao se analisar os estudos que usaram as duas técnicas de avaliação de esteatose (histologia e conteúdo de triglicerídeos hepáticos). Um deles, ao utilizar a técnica de histologia, não foi capaz de identificar diferenças ao comparar o grupo controle hiperlipídico com o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada; o efeito potencializador das gorduras quimicamente modificadas sobre a esteatose hepática só foi detectado quando a análise do conteúdo de triglicerídeos hepático foi utilizada. Tal diferença pode ser relacionada aos tamanhos das amostras - dado que o estudo em questão utilizou uma maior quantidade de animais para avaliar a esteatose por conteúdo de triglicerídeos hepáticos -, ou às próprias técnicas utilizadas. Enquanto na avaliação histológica uma parte pequena do órgão é usada, a análise de conteúdo de triglicerídeos utiliza uma porção maior desse órgão, o que pode criar um viés de amostragem: uma seção sem esteatose pode ser analisada (MA et al., 2009). É interessante, portanto, que estudos futuros utilizem mais de uma técnica para avaliação da esteatose, visto que uma maior sensibilidade pode ser necessária para se detectar variações entre uma dieta hiperlipídica com e sem gordura quimicamente modificada.

Levando em conta os estudos que realizaram avaliação de esteatose por triglicerídeos, foi

demonstrado que a gordura quimicamente modificada, quando incorporada a uma dieta hiperlipídica, levou à piora do quadro de esteatose em relação à dieta controle hiperlipídica apenas em dois estudos. Neles, uma das intervenções dietéticas usou gordura *trans*, e a outra, interesterificada. Já nos outros dois estudos que avaliaram a esteatose por triglicerídeos hepáticos, um utilizou gordura *trans*; o outro estudo incorporou um outro tipo de gordura quimicamente modificada na dieta. Comparando os dois estudos que usaram gordura *trans*, tendo um deles encontrado aumento da esteatose quando incluída a *trans* numa dieta hiperlipídica em relação à hiperlipídica sem gordura quimicamente modificada e o outro não, foram destacadas nuances interessantes: o estudo que detectou a piora da esteatose utilizou apenas camundongos fêmeas, e uma intervenção dietética de 24 semanas de duração. Já o estudo que não encontrou diferenças entre a dieta hiperlipídica com *trans* e o controle hiperlipídico usou camundongos machos e 8 semanas de intervenção dietética. Curiosamente, o estudo que encontrou uma piora da esteatose quando a gordura interesterificada era incorporada a uma dieta hiperlipídica - novamente em relação ao controle hiperlipídico, comparação que permite detectar os efeitos do uso de gordura quimicamente modificada em relação ao mero controle positivo - utilizou, também, animais machos e 8 semanas de dieta, bem como o estudo com *trans* que não encontrou variação. No entanto, este estudo utilizou 100% de gordura quimicamente modificada em sua dieta, diferente do estudo com *trans* que utilizou um desenho experimental parecido, mas com apenas 58,60% da gordura sendo *trans*.

Os desfechos secundários - que foram avaliados apenas de forma qualitativa em nossa busca, sendo usados apenas como suporte para o fato de haver desenvolvimento de DHGNA - não foram avaliados por todos os estudos. A inflamação hepática foi o desfecho secundário mais avaliado, mas por meio de diferentes métodos. As avaliações histológicas não diferiram entre os grupos, ou foram julgadas como inconclusivas; os estudos que avaliaram as citocinas IL-6 e IL-10 no fígado também não encontraram diferenças entre as intervenções. Já dentre os estudos que avaliaram TNF- $\alpha$ , apenas um deles encontrou concentrações mais elevadas dessa citocina no grupo que recebeu dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada em relação ao grupo controle normolipídico; no entanto, em relação ao grupo controle hiperlipídico, não foram encontradas variações. Adicionalmente, foram detectados níveis mais altos de iNOS no único estudo que avaliou este marcador, mas apenas em relação ao grupo controle normolipídico; SOCS1 apresentou um aumento em relação apenas ao controle hiperlipídico, também no único estudo que o avaliou; já os níveis de IL-1 $\beta$  eram mais altos em comparação com ambas as dietas controle no trabalho que o utilizou como marcador.

Ainda sobre os desfechos secundários, a fibrose hepática - um dos quadros progressivos de DHGNA - foi avaliada com uso de histologia em três estudos, e em dois deles, aumentou no grupo com dieta hiperlipídica e gordura quimicamente modificada em relação ao controle normolipídico; em um desses estudos, estava aumentada também em relação ao grupo controle hiperlipídico. No outro estudo, no entanto, não foram detectadas diferenças na fibrose entre os

grupos. As enzimas marcadoras de função hepática, ALT e AST, também foram analisadas em três estudos. Neles, foram encontrados níveis aumentados de ALT em relação às dietas controle normolipídica e hiperlipídica, com exceção de uma das dietas do estudo de Dhibi et al., com óleo de soja oxidado, que não encontrou diferenças em relação aos controles. Já a AST foi analisada em apenas dois estudos, e ambos detectaram níveis aumentados da enzima em relação à dieta controle normolipídica; em um deles - Dhibi et al., que apresentou duas intervenções -, no entanto, tal aumento foi encontrado apenas na dieta com margarina, não havendo variação na intervenção com óleo de soja oxidado. Por fim, o estresse oxidativo e a capacidade antioxidante foram avaliados em apenas 2 dos 6 estudos por meio de vários marcadores: catalase, SOD, GPx, MDA (enzimas antioxidantes), dienos conjugados e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (marcadores de estresse oxidativo). Ambos os estudos encontraram estresse oxidativo aumentado no grupo de dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada em relação aos controles normolipídico e hiperlipídico: em um dos estudos, foram avaliadas apenas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; no outro, foram avaliadas ambas as enzimas antioxidantes e dienos conjugados.

A fonte de gordura que foi quimicamente modificada variou entre os estudos. Dois estudos utilizaram óleo de palma - um deles interesterificado (o único com este tipo de gordura quimicamente modificada) e outro *trans* -; e os outros estudos utilizaram óleo de soja, óleo de coco e óleo de canola, além de um estudo que não informou a fonte de gordura utilizada. No caso de Dhibi et al., uma das dietas usou óleo de soja oxidado (*trans*), enquanto a outra dieta de intervenção usou margarina (*trans*), mas sem informar a fonte que passou pela modificação química.

A porcentagem de energia proveniente de gordura nas dietas também diferiu, mesmo nos grupos controle. As dietas controle normolipídicas, usadas como controle negativo, variaram entre 9,47 e 25% de kcal provenientes de lipídios em sua composição. Já o controle positivo dos estudos - a dieta controle hiperlipídica - variou entre 41,67 e 63,60%.

O controle positivo - a dieta hiperlipídica sem gordura quimicamente modificada - piorou o quadro de esteatose em todos os estudos, independente do sexo dos animais e do tempo de intervenção dietética; o mesmo aconteceu para o grupo experimental de interesse para nossa revisão, utilizando dieta hiperlipídica com gordura quimicamente modificada. Para se elucidar quais efeitos podem ser atribuídos à gordura quimicamente modificada e quais são provenientes de uma mera dieta hiperlipídica, no entanto, deve-se comparar as duas intervenções hiperlipídicas.

As dietas hiperlipídicas com gordura quimicamente modificada - nossa intervenção de interesse - foram uma outra importante fonte de heterogeneidade. A porcentagem de kcal proveniente de lipídios diferiu entre 41,67% e 63,60%, a mesma variação encontrada nas dietas controle hiperlipídicas. As maiores diferenças, no entanto, foram encontradas na porcentagem de gordura quimicamente modificada em relação ao total de gordura - que variou de 1,23 a 100% -

e, conseqüentemente, na porcentagem de kcal vindas especificamente de gordura quimicamente modificada, que variou de 2,56 a 45%.

O período de duração das intervenções dietéticas foi a maior diferença encontrada em relação ao desenho experimental, tendo variado de 4 a 24 semanas. Um dos estudos usou o tempo mínimo de 4 semanas; outros dois estudos utilizaram 8 semanas de intervenção; os maiores períodos de aplicação da dieta foram observados nos outros três estudos, que submeteram os animais a 16, 20 e 24 semanas de intervenção.

Apesar desta não ser uma fonte de heterogeneidade, o sexo dos animais usados nos experimentos também é uma questão que merece destaque. Dos seis estudos incluídos, cinco utilizaram machos. A doença hepática gordurosa não-alcoólica, no entanto, tem características sexualmente dimórficas: por exemplo, em humanos, a DHGNA afeta mais homens do que mulheres, que, na pré-menopausa, estão mais protegidas desta doença hepática, só se tornando mais propensas a seu desenvolvimento após a menopausa, associada a esteatose severa e fibrose hepática (BALLESTRI et al., 2017). Além das particularidades quanto à DHGNA, há uma discussão geral sobre sexo e gênero como uma variável biológica de interesse, que precisa ser considerada não apenas em estudos clínicos, mas também em modelos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* (BHARGAVA; HUNT, 2021).

Importantes fontes de incerteza e alto risco de viés foram identificadas dentre os seis artigos incluídos. A incerteza foi de 100% para a geração de sequência aleatória (viés de seleção), ocultação de alocação (viés de seleção), cegamento de pessoal (viés de performance) e cegamento de avaliação do desfecho (viés de detecção). Nenhum dos seis estudos relatou ter gerado uma sequência aleatória ou realizado cegamento da equipe envolvida no estudo, pontos importantes para a minimização do viés na pesquisa. A incerteza também esteve presente em algumas características dos animais: em alguns estudos, não foram informados dados sobre o sexo, idade ou peso corporal dos animais ao início do experimento, fatores de interesse em relação ao desenho experimental. A classificação como alto risco de viés só foi identificada em três domínios: dados de desfecho incompletos (viés de atrito), relatório seletivo de desfechos (viés de relato) e outras fontes de viés (outro). Este resultado aponta questões importantes: estudos sobre gorduras quimicamente modificadas e DHGNA precisam passar a relatar todos os desfechos e informar apropriadamente os dados coletados, tornando mais transparentes os experimentos e seus resultados. Além disso, a atenção à composição das dietas deve ser direcionada não só à sua padronização, mas também a possíveis itens capazes de influenciar no desenvolvimento de DHGNA além da gordura, como a sacarose (JENSEN et al., 2018). Por fim, todos os estudos informaram sua fonte de financiamento, e nenhuma delas foi julgada como uma potencial fonte de viés: nenhum dos trabalhos recebeu subsídios provenientes da indústria de alimentos.

Embora a análise realizada aponte uma lacuna fundamental no conhecimento, é importante reconhecer limitações relevantes desse estudo. Devido ao pouco tempo disponível para realização do trabalho, a busca bibliográfica foi apenas realizada na base de dados

*MEDLINE*. Enquanto a maioria dos estudos pré-clínicos seja publicada em revistas indexadas nessa base, é possível que nossa análise não tenha incluído todos os estudos publicados sobre o assunto. Nossa busca foi complementada com a leitura de referências listadas por estudos incluídos e buscas manuais, a fim de minimizar essa limitação. Como perspectiva futura, pretende-se realizar uma busca bibliográfica complementar também nas bases de dados *Web of Science* e *EMBASE*.

## CONCLUSÃO

A principal conclusão de nosso estudo é a de que há uma lacuna no conhecimento de como as gorduras quimicamente modificadas influenciam no desenvolvimento de DHGNA em roedores. Apesar de haver muitos estudos sobre efeitos de dietas hiperlipídicas na esteatose hepática, devido a diversos fatores de confusão, os achados desses trabalhos pré-clínicos são insuficientes, não sendo possível sumarizar todas as evidências devido à heterogeneidade dos ensaios.

Os estudos incluídos confirmam a relação entre o consumo de gorduras quimicamente modificadas e o desenvolvimento de DHGNA: em comparação aos grupos controle que recebiam dietas normolipídicas, as dietas hiperlipídicas com gorduras *trans* e interesterificadas aumentaram a esteatose hepática dos roedores. No entanto, a heterogeneidade dos experimentos se apresenta como um desafio: as diferenças no desenho experimental e, principalmente, na composição das dietas, abre espaço para críticas. A validade dos resultados e as conclusões sobre o impacto do consumo de gorduras *trans* e interesterificadas sobre a saúde do fígado podem ser questionadas devido à variação dos estudos e possíveis fatores de confusão, como a inclusão de outros itens alimentares na dieta, tal como a sacarose, destacada como uma fonte de viés dos trabalhos. Também é crucial que os estudos passem a relatar procedimentos de aleatorização dos animais na sua divisão em grupos e cegamento dos pesquisadores envolvidos no experimento ao dividir os animais e avaliar os resultados dos estudos em cada grupo; além disso, as características dos animais ao início do experimento - como seu peso e idade - também devem ser explicitadas. Um outro ponto importante é o relato completo dos desfechos, dado que o relatório seletivo de desfechos com apresentação parcial da evidência foi a fonte de maior risco de viés.

Em resumo, são necessários mais estudos sobre as intervenções dietéticas usadas para o estudo da DHGNA em roedores, além de uma padronização da composição das dietas e o tempo de intervenção dos estudos. Também é interessante que, ao se avaliar a esteatose, os trabalhos utilizem mais de uma técnica, a fim de garantir o resultado desta análise. Há, ainda, uma necessidade crescente de se levar o gênero dos animais como uma variável biológica de interesse, e portanto, mais trabalhos com roedores fêmeas são necessários.

## REFERÊNCIAS

- ADACHI, M.; BRENNER, D. A. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 677–685, 2008.
- ALFIERI, A. et al. Effects of Plant Oil Interesterified Triacylglycerols on Lipemia and Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 30 dez. 2017.
- ALWAHSH, S. M.; GEBHARDT, R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 1545–1563, abr. 2017.
- AMEER, F. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**, v. 63, n. 7, p. 895–902, 1 jul. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Atualizada regra sobre uso de gorduras trans industriais. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/atualizada-regra-sobre-uso-de-gorduras-trans-industriais>>. Acesso em: 18 set. 2021.
- ASCHERIO, A. Trans fatty acids and blood lipids. **Atherosclerosis Supplements**, First International Symposium on Trans Fatty Acids and Health. v. 7, n. 2, p. 25–27, 1 maio 2006.
- ASCHERIO, A.; WILLETT, W. C. Health effects of trans fatty acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 1006S-1010S, 1 out. 1997.
- BALLESTRI, S. et al. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 6, p. 1291–1326, 2017.
- BASARANOGLU, M. et al. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 8, p. 1166–1172, 28 fev. 2013.
- BEGRICHE, K. et al. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. **Mitochondrion**, v. 6, n. 1, p. 1–28, 1 fev. 2006.
- BERGHEIM, I. et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 983–992, 1 jun. 2008.
- BERNÁ, G.; ROMERO-GOMEZ, M. The role of nutrition in non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. **Liver International**, v. 40, n. S1, p. 102–108, 2020.
- BERRY, S. E. et al. Interesterified fats: What are they and why are they used? A briefing report from the Roundtable on Interesterified Fats in Foods. **Nutrition Bulletin**, v. 44, n. 4, p. 363–380, 2019.
- BHARGAVA, A. et al. **Considering Sex as a Biological Variable in Basic and Clinical Studies**. Disponível em: <<https://www.endocrine.org/advancing-research/scientific-statements/considering-sex-as-a-biological-variable-in-basic-and-clinical-studies>>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- BISPO, K. P. et al. Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat offspring. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 65, n. 1, p. 131–138, 1 jan. 2015.
- BUGIANESI, E. et al. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 17, p. 1941–1951, jun. 2010.
- BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p.

1038–1048, ago. 2016.

CALZADILLA BERTOT, L.; ADAMS, L. A. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 20 maio 2016.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 9, n. 2, p. 191–200, 20 abr. 2013.

CRESPO, J. et al. Gene expression of tumor necrosis factor [alpha ] and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1158–1163, 1 dez. 2001.

CUSI, K. Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, Nonalcoholic Steatohepatitis. v. 13, n. 4, p. 545–563, 1 nov. 2009.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; CARAMUJO, M. J. The Various Roles of Fatty Acids. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 10, 09 2018.

DHAKA, V. et al. Trans fats—sources, health risks and alternative approach - A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 534–541, 1 out. 2011.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 103, n. 2, p. 71–83, fev. 2010.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1746–1755, 21 fev. 2014.

FIELDING, C. M.; ANGULO, P. Hepatic steatosis and steatohepatitis: Are they really two distinct entities? **Current Hepatology Reports**, v. 13, n. 2, p. 151–158, 1 jun. 2014.

FRIEDRICH, J. O., ADHIKARI, N. K., & BEYENE, J. (2011). Ratio of means for analyzing continuous outcomes in meta-analysis performed as well as mean difference methods. **Journal of clinical epidemiology**, 64(5), 556-564.

GBD 2015 OBESITY COLLABORATORS et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 1, p. 13–27, 06 2017.

GEBAUER, S. K.; PSOTA, T. L.; KRIS-ETHERTON, P. M. The diversity of health effects of individual trans fatty acid isomers. **Lipids**, v. 42, n. 9, p. 787–799, set. 2007.

GINTER, E.; SIMKO, V. New data on harmful effects of trans-fatty acids. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 117, n. 5, p. 251–253, 2016.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 9, p. 1905–1914, 9 jan. 2007.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, p. 43, 26 mar. 2014.

HUNT, K. CNN, K. H. **Lab rats are overwhelmingly male, and that's a problem**. Disponível em: <<https://www.cnn.com/2021/05/14/health/sex-biological-variable-research-science-drugs-scn/index.html>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

IHKUNI, N. et al. Leptin and Inflammation. **Current immunology reviews**, v. 4, n. 2, p. 70–79, 1 maio 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **International Diabetes Federation Diabetes Atlas**. Disponível em: <[https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF\\_Atlas\\_9th\\_Edition\\_2019.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019/IDF_Atlas_9th_Edition_2019.pdf)>. Acesso em: 27 mar. 2020.

- ISMAIL, S. R. et al. Systematic review of palm oil consumption and the risk of cardiovascular disease. **PloS One**, v. 13, n. 2, p. e0193533, 2018.
- IWABU, M. et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 $\alpha$  and mitochondria by Ca<sup>2+</sup> and AMPK/SIRT1. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1313–1319, abr. 2010.
- JEGATHEESAN, P.; DE BANDT, J.-P.  
Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 3, 3 mar. 2017.
- JENSEN, T. et al. Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of hepatology**, v. 68, n. 5, p. 1063–1075, maio 2018.
- JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 72, 02 2016.
- KHAIRALLAH, R. J. et al. Treatment with Docosahexaenoic Acid, but Not Eicosapentaenoic Acid, Delays Ca<sup>2+</sup>-Induced Mitochondria Permeability Transition in Normal and Hypertrophied Myocardium. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 335, n. 1, p. 155–162, out. 2010.
- KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, jun. 2005.
- KOLAK, M. et al. Adipose tissue inflammation and increased ceramide content characterize subjects with high liver fat content independent of obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 1960–1968, ago. 2007.
- KUBRUSLY, M. S. et al. A role for mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in non alcoholic steatohepatitis related-cirrhosis. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 9, p. 1123–1131, 2010.
- LAVRADOR, M. S. F. et al. Interesterified Fats Induce Deleterious Effects on Adipose Tissue and Liver in LDLr-KO Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 22 fev. 2019.
- LI, L. et al. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 6, p. 510–519, 2016.
- LOPEZ-GARCIA, E. et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 3, p. 562–566, mar. 2005.
- MA, X. et al. Imaging-based Quantification of Hepatic Fat: Methods and Clinical Applications. **RadioGraphics**, v. 29, n. 5, p. 1253–1277, 1 set. 2009.
- MACHADO, M. V.; DIEHL, A. M. The hedgehog pathway in nonalcoholic fatty liver disease. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 53, n. 3, p. 264–278, jun. 2018.
- MAGRI, T. P. R. et al. Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male offspring. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 34, n. 5, p. 904–910, out. 2015.
- MALTA, D. C. et al. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599–608, dez. 2014.
- MANTOVANI, A. Plasma trans-fatty acid and risk of nonalcoholic fatty liver disease: New data from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **International Journal of Cardiology**, v. 272, p. 329–330, 01 2018.
- MARTIN, C. A. et al. Trans fatty acid-forming processes in foods: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 343–350, jun. 2007.
- MATHIAS, M. **Na hora H, Anvisa adia retirada de produtos com gorduras trans das**

- prateleiras. o Joio e o Trigo**, 30 jun. 2021. Disponível em: <<https://ojoioeotrigo.com.br/2021/06/na-hora-h-anvisa-adia-em-18-meses-eliminacao-de-gorduras-trans/>>. Acesso em: 18 ago. 2021
- MENDEZ-SANCHEZ, N. et al. New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, 13 jul. 2018.
- MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Trans Fatty Acids: Effects on Cardiometabolic Health and Implications for Policy. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 79, n. 3–5, p. 147–152, 2008.
- MILLS, C. E.; HALL, W. L.; BERRY, S. E. E. What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet? **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 153–158, 1 jun. 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018**. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- MIYAMOTO, J. É. et al. Interesterified soybean oil promotes weight gain, impaired glucose tolerance and increased liver cellular stress markers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 59, p. 153–159, 1 set. 2018.
- MOON, Y.-A. The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. **Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 6–10, mar. 2017.
- MOTA, M. et al. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 8, p. 1049–1061, ago. 2016.
- MOZAFFARIAN, D. et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 606–612, abr. 2004.
- MOZAFFARIAN, D. et al. Trans fatty acids and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 15, p. 1601–1613, 13 abr. 2006.
- MU, H.; HØY, C.-E. The digestion of dietary triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 105–133, 1 mar. 2004.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 1, p. 175–191, 1 jan. 2013.
- NASSIR, F. et al. Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 167–175, mar. 2015.
- NG, Y. T. et al. Interesterified Palm Olein (IEPalm) and Interesterified Stearic Acid-Rich Fat Blend (IESTear) Have No Adverse Effects on Insulin Resistance: A Randomized Control Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 8, 17 ago. 2018.
- OLIGSCHLAEGER, Y.; SHIRI-SVERDLOV, R. NAFLD Preclinical Models: More than a Handful, Less of a Concern? **Biomedicines**, v. 8, n. 2, p. 28, 8 fev. 2020.
- OLIVEIRA, C. P. M. S. DE; COTRIM, H. P.; ARRESE, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Risk Factors in Latin American Populations: Current Scenario and Perspectives. **Clinical Liver Disease**, v. 13, n. 2, p. 39–42, 1 fev. 2019.
- PEREIRA, R. A. et al. Sources of excessive saturated fat, trans fat and sugar consumption in Brazil: an analysis of the first Brazilian nationwide individual dietary survey. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 113–121, jan. 2014.
- PESSAYRE, D.; FROMENTY, B. NASH: a mitochondrial disease. **Journal of Hepatology**, v.

42, n. 6, p. 928–940, 1 jun. 2005.

PEVERILL, W.; POWELL, L. W.; SKOIEN, R. Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 8591–8638, maio 2014.

PIKARSKY, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 461–466, 23 set. 2004.

PINEL, A. et al. Modulation of Insulin Resistance and the Adipocyte-Skeletal Muscle Cell Cross-Talk by LCn-3PUFA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 15 set. 2018.

PODRINI, C. et al. Redox homeostasis and epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 15, p. 2737–2746, 2013.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 60–78, jan. 2015.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 82–97, 2019.

POSTIC, C.; GIRARD, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 829–838, 3 mar. 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, nov. 1993.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, 30 mar. 2018.

ROSQVIST, F. et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2356–2368, jul. 2014.

SALES, R. C. et al. Olive Oil, Palm Oil, and Hybrid Palm Oil Distinctly Modulate Liver Transcriptome and Induce NAFLD in Mice Fed a High-Fat Diet. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 20 dez. 2018.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 1–40, jan. 2013.

SATCHITHANANDAM, S. et al. Trans, saturated, and unsaturated fat in foods in the united states prior to mandatory trans-fat labeling. **Lipids**, v. 39, n. 1, p. 11–18, 1 jan. 2004.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, 4 jun. 2011.

SEKI, S.; KITADA, T.; SAKAGUCHI, H. Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. **Hepatology Research**, v. 33, n. 2, p. 132–134, 1 out. 2005.

SEO, Y. Y. et al. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. **Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 41–45, mar. 2013.

SHEN, W. et al. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. **Obesity research**, v. 11, n. 1, p. 5–16, jan. 2003.

STEFAN, N.; KANTARTZIS, K.; HÄRING, H.-U. Causes and Metabolic Consequences of Fatty Liver. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 939–960, 1 dez. 2008.

STIENSTRA, R. et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 $\beta$ -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activity. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 511–522, 1 fev. 2010.

SUNDRAM, K.; KARUPAIAH, T.; HAYES, K. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutrition & Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 3, 15 jan. 2007.

TILG, H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Cytokine-Adipokine Interplay and Regulation of Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 934–945, 1 set. 2006.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, out. 2006.

TSOCHATZIS, E. A.; PAPATHEODORIDIS, G. V.; ARCHIMANDRITIS, A. J. **Adipokines in Nonalcoholic Steatohepatitis: From Pathogenesis to Implications in Diagnosis and Therapy**. Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2009/831670/>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

TSOCHATZIS, E.; PAPATHEODORIDIS, G. V.; ARCHIMANDRITIS, A. J. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 11, p. 2629–2640, nov. 2006.

VELASCO, P. C. DE et al. Maternal intake of trans-unsaturated or interesterified fatty acids during pregnancy and lactation modifies mitochondrial bioenergetics in the liver of adult offspring in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 1, p. 41–52, jul. 2017.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 3, p. 274–285, ago. 2011.

WANG, J. et al. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 713–723, ago. 2009.

WATANABE, A. et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 6, p. G1248–G1257, 1 jun. 2009.

**WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>>. Acesso em: 8 mar. 2020.

WILCZEK, M. M.; OLSZEWSKI, R.; KRUPIENICZ, A. Trans-Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Urgent Need for Legislation. **Cardiology**, v. 138, n. 4, p. 254–258, 2017.

YILMAZ, Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 36, n. 9, p. 815–823, 2012.

YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11–20, jan. 2018.

YOUNOSSI, Z.; HENRY, L. Contribution of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease to the Burden of Liver-Related Morbidity and Mortality. **Gastroenterology**, Commonalities and Distinctions Between Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. v. 150, n. 8, p. 1778–1785, 1 jun. 2016.

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

YU, L. et al. Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 46, n. 1, p. 33–44, fev. 2014.

**APÊNDICE A - Protocolo do PROSPERO**

## Citation

André Almo de Moraes Coutinho, Janaína Carvalho Guimarães, Martina Rudnicki, Fernanda Torres Quitete, Julio Beltrame Daleprane. Chemically modified lipids in the development of non-alcoholic fatty liver disease in preclinical rodent models: A systematic review.. PROSPERO 2020 CRD42020212189 Available from: [https://www.crd.york.ac.uk/prospERO/display\\_record.php?ID=CRD42020212189](https://www.crd.york.ac.uk/prospERO/display_record.php?ID=CRD42020212189)

## Review question

How do chemically modified lipids consumed in the diet impact the onset and progression of NAFLD in preclinical models?

An inadequate diet is one of the main risk factors for the development of chronic diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which affects 25% of the world's adult population. Amongst other dietary factors, an individual's lipid consumption pattern - regarding not only quantity but also the type of fat - is closely related to NAFLD. Chemically modified lipids, such as trans fatty acids and interesterified fats, have been largely used in the food industry to elaborate products attractive to consumers. Their inclusion in the diet, however, has deleterious effects: trans fatty acids consumption has been linked to a rise in the risk of developing cardiovascular and metabolic diseases, which lead to limitations and sanctions to the use of trans fatty acids worldwide. Aiming at replacing trans fats, the food industry started to use the interesterified fats, whose impact on the metabolism is controversial; several studies, however, have already demonstrated deleterious effects through its consumption, like the development of metabolic disorders and NAFLD. Understanding how preclinical studies regarding chemically modified lipids consumption are conducted - in terms of diet composition and animal models - is necessary for assessing the quality and accuracy of the studies' results, leading to a better understanding of how interesterified fats lead to NAFLD, how they impact human health and how to better conduct experiments on the effects of the inclusion of interesterified fats in the diet.

## Context and rationale

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a heterogeneous condition characterized by lipid accumulation in the liver, which may compromise the function of this organ and progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. This silent condition affects around 25% of the adult population and its increasing prevalence constitutes a major threat to public health worldwide. Several lines of evidence reinforce the idea that diet indeed plays a central role in NAFLD pathogenesis. In this regard, not only the amount of fat intake but also the type of dietary fat - including chemically modified lipids, such as interesterified fats - may influence its development. Rodent models have been widely used to understand the NAFLD pathogenesis and mimic the human disease in preclinical studies. However, the heterogeneity of diets, as well as little attention directed at the source of the dietary components and a lack of standardization of control groups may compromise the accuracy and interpretation of the studies' findings, even questioning the veracity of claims that chemically modified lipids' consumption is linked to deleterious effects. Thus, we will systematically assess the preclinical literature examining the diet composition, with a special focus on chemically modified fats and rodent models of NAFLD.

## Searches

PubMed, Embase, and Web of Science will be searched for studies on non-alcoholic fatty liver disease using rodents (rats, mice and hamsters) and dietary interventions with chemically modified lipids. Reference lists of identified articles, retrieved books, reviews, and 'similar articles' suggested by the databases will be manually searched for additional eligible studies not retrieved by our search, based on their title. This additional strategy will be used as a complementary at the end of the research, in order to find specific papers possibly not included in the search.

## Study designs to be included

### Inclusion criteria:

Rodent studies of NAFLD induced by dietary interventions with the use of chemically modified fats.

### Exclusion criteria:

Chemical or pharmacological induction of hepatic disease.

### Human disease modelled

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

NAFLD is a heterogeneous condition characterized by lipid accumulation in the liver, exceeding 5% of its weight, in a patient without a significant history of alcohol use and without other conditions leading to the accumulation of fat in the liver. This disease may compromise the function of this organ and progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It affects around 25% of the adult population and its increasing prevalence constitutes a major threat to public health worldwide. Several lines of evidence reinforce the idea that diet indeed plays a central role in NAFLD pathogenesis. In this regard, not only the amount of fat intake but also the type of dietary fat - which includes chemically modified lipids, widely used by the food industry in various products - may influence its development.

### Animals/population

#### Inclusion criteria:

Rodents (rats, mice and hamsters).

#### Exclusion criteria:

Transgenic animal models and non-rodent animals.

### Intervention(s), exposure(s)

#### Inclusion criteria:

Dietary interventions using chemically modified lipids, with and without the addition of sucrose.

#### Exclusion criteria:

Rodents (rats, mice and hamsters) challenged with a diet not suitable for replication; lipid sources not coming from the diet; chemical or pharmacological induction of NAFLD, using any route of administration; high-fructose diets; diets with variation of amino acids. There will be no restrictions in regard to the duration of the intervention, the nutritional composition of the diet, the diet supplier, the method used for the chemical modification of fat, and housing conditions.

### Comparator(s)/control

#### Inclusion criteria:

Rodents (rats, mice and hamsters) that were fed with a standard chow diet.

#### Exclusion criteria:

Rodents (rats, mice and hamsters) submitted to a diet not suitable for replication.

### Other selection criteria or limitations applied

Other exclusion criteria: articles with abstracts in English but with full-text in other languages; papers published before 1993 (year of publication of the establishment of the most recent American Institute of Nutrition (AIN) formula of a purified diet for experimental rodents (AIN-93)); papers with insufficient information on NAFLD parameters; dissertations, theses, letters, news, duplicated articles, conference abstracts and review articles will also be excluded.

### Outcome measure(s)

#### Inclusion criteria:

The primary outcome will be steatosis.

Secondary outcomes will be inflammation markers (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), liver enzymes (aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT)), oxidative damage stress markers (peroxidation products: lipid peroxidation products (malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE)), thiobarbituric acid reactive substances, F2-isoprostanes, DNA damage; antioxidants: glutathione (GSH),

GSH to GSSG ratio, enzymes with antioxidant activity (superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT))).

#### Exclusion criteria:

No assessment of hepatic morphological/functional changes.

#### Study selection and data extraction

##### Procedure for study selection

Study selection will be performed in two stages. The first will be based on title and summary and the second will be based on the full-text screening. The two screening stages will be conducted by two independent reviewers. A third reviewer will be consulted to resolve discrepancies.

Select phase (first stage): In this step, the articles will be selected based on the reading of the title and the abstract. Those will be included according to the PICO points and the eligibility criteria defined in this protocol. Select phase (second stage): In this step, the articles will be selected based on reading the full text. Those will be included according to the PICO points and the eligibility criteria defined in this protocol. Screening phase 2 will be considered similar exclusion criteria employed in screening phase 1.

##### Prioritise the exclusion criteria

Screening phase 1:

- Not an original article (review/commentary/systematic review/meta-analysis)
- in vitro studies
- Studies involving any animal other than rats, mice and hamsters
- Studies involving transgenic rodent models
- Studies with no dietary intervention enriched in fat to induce NAFLD, such as pharmacological/chemical interventions, diets not enriched in fat, and diets with aminoacid modifications
- Not in English
- Studies published before 1993

Screening phase 2 will be considered similar exclusion criteria employed in screening phase 1, with the addition of the following:

- Studies not using chemically modified fats
- No hepatic morphology or functional outcome measured (steatosis, inflammation markers, liver enzymes, oxidative stress markers)
- No control of confounding variables
- No control of diet components
- Not enough information on the diet used in the intervention
- Full-text irretrievable

##### Methods for data extraction

Data will be extracted from graphs and tables of included studies. Data from graphs will be extracted with the

use of digitizing software. Due to time constraints, authors will not be contacted in case of missing data.

The two screening stages will be conducted by two independent reviewers. A third reviewer will be consulted to resolve discrepancies, analyzing studies according to the defined inclusion and exclusion criteria.

#### Data to be extracted: study design

Data will be extracted on the basic characteristics of the experimental groups of the articles, such as housing conditions (animals per cage, controlled temperature and humidity, space, light cycle), the number of experimental groups, and the number of animals per group.

#### Data to be extracted: animal model

Data will be extracted on which animal was used (species and strain background), age, sex, weight at the beginning and at the end of the dietary intervention.

#### Data to be extracted: intervention of interest

The following information regarding the characteristics of the intervention will be extracted: Nutritional composition and type of fat, type of chemical modification used in fat, diet supplier (purified or commercial), the period of intake.

#### Data to be extracted: primary outcome(s)

Steatosis assessed by one of the following methods: histology, stereology, or colorimetric assays. This outcome will be considered as a categorical (dichotomous) variable. We will extract the mean and standard deviation.

#### Data to be extracted: secondary outcome(s)

Secondary outcomes extracted will be inflammation markers (continuous variable, assessed by ELISA, Western Blotting, PCR), liver enzymes (continuous, assessed by colorimetric assays), oxidative damage markers (continuous, assessed by colorimetric assays). For all outcomes, we will extract the means and standard deviation (SD) estimates.

#### Data to be extracted: other

Bibliographic details such as article title, authors, year of publication and journal will be also collected.

#### Risk of bias and/or quality assessment

By use of SYRCLE's risk of bias tool.

The risk assessment of bias will be performed by two reviewers.

To describe the intensity of agreement between the two reviewers we will use the kappa index. The calculation of the kappa will be performed to measure the degree of agreement beyond what would be expected by random chance. In case of discrepancies, a third reviewer will be consulted to resolve the discrepancy.

#### Strategy for data synthesis

##### Planned approach

We will provide a qualitative systematic review, with data synthesized in a table with the most relevant characteristics and outcomes from the included studies. This table will summarize the design characteristics of the included studies, such as rodent characteristics, differences in diet composition, and period reported along with the measurements of primary and secondary outcomes extracted.

For each outcome, depending on the degree of homogeneity of the results, we will present the data applying the meta-analysis, using data from two or more studies. The results will be combined through a random-effects model with the restricted maximum likelihood estimator of between-study variance. However, if there is marked heterogeneity ( $I^2 > 40\%$ ), it will not be feasible to perform the meta-analysis. Studies with insufficient data will also be excluded from the meta-analysis.

### Effect measure

For continuous outcomes, we will employ the ratio of means, and for dichotomous outcomes, the odds ratio.

### Effect models

The results will be provided under a random-effects model since we anticipate there will be statistical heterogeneity.

### Heterogeneity

Dietary composition, animal species, strain background, age, sex, exposure period to the diet will be examined as possible sources of heterogeneity. The heterogeneity will be tested using Cochran's Q test. When appropriate, meta-regression models will be used.

### Other

We will apply a correction in case of the use of multiple control groups.

### Analysis of subgroups or subsets

#### Subgroup analyses

No subgroup analyses are planned at the present moment.

#### Sensitivity

No sensitivity analyses are planned at the present moment.

#### Publication bias

Funnel plot asymmetry will be evaluated graphically and formally tested via Egger's test.

### Contact details for further information

André Almo de Moraes Coutinho  
andrealmo@hotmail.com

### Organisational affiliation of the review

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)  
<https://www.uerj.br/>

### Review team members and their organisational affiliations

Mr André Almo de Moraes Coutinho. Rio de Janeiro State University  
Ms Janaína Carvalho Guimarães. Rio de Janeiro State University  
Professor Martina Rudnicki. Rio de Janeiro State University  
Dr Fernanda Torres Quitete. Rio de Janeiro State University  
Professor Julio Beltrame Daleprane. Rio de Janeiro State University

### Review type

Pre-clinical animal intervention review

### Anticipated or actual start date

23 November 2020

### Anticipated completion date

30 June 2021

### Funding sources/sponsors

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

### Grant number(s)

(E-26/010.002203/2019 - Brazil)

### Conflicts of interest

### Language

English

### Country

Brazil

### Stage of review

Review Ongoing

### Subject index terms status

Subject indexing assigned by CRD

### Subject index terms

Animals; Biochemical Phenomena; Lipid Metabolism; Lipids; Non-alcoholic Fatty Liver Disease; Rodentia

### Date of registration in PROSPERO

30 November 2020

### Date of first submission

09 October 2020

### Stage of review at time of this submission

Stage	Started	Completed
Preliminary searches	Yes	No
Piloting of the study selection process	Yes	No
Formal screening of search results against eligibility criteria	No	No
Data extraction	No	No
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	No	No

*The record owner confirms that the information they have supplied for this submission is accurate and complete and they understand that deliberate provision of inaccurate information or omission of data may be construed as scientific misconduct.*

*The record owner confirms that they will update the status of the review when it is completed and will add publication details in due course.*

### Versions

30 November 2020

## APÊNDICE B - Critérios de exclusão dos artigos

### Fase 1 da seleção:

- Artigos de revisão, comentários, revisões sistemáticas e meta-análises;
- Estudos *in vitro*;
- Estudos envolvendo animais que não roedores (ratos, camundongos e hamsters);
- Estudos com modelos de roedores transgênicos;
- Estudos de programação metabólica;
- Estudos com indução farmacológica ou química de DHGNA, com intervenção dietética incluindo modificação na composição de aminoácidos, frutose, ou sem intervenção dietética hiperlipídica;
  - Artigos publicados em idiomas diferentes de inglês;
  - Estudos publicados antes de 1993;
  - Duplicata;
  - Intervenção adicional à indução de DHGNA por dieta.

### Fase 2 da seleção:

- Critérios de exclusão similares aos da fase 1;
- Sem análise de morfologia ou funcionalidade hepática (esteatose, marcadores inflamatórios, enzimas hepáticas, marcadores de estresse oxidativo);
  - Sem controle de componentes da dieta;
  - Informação insuficiente sobre a dieta usada na intervenção;
  - Texto completo indisponível;
  - Ausência de grupos controle (normolipídico e hiperlipídico sem gordura quimicamente modificada).

## ANEXO A – Divulgação Científica

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é definida pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado, que pode comprometer a sua função e levar a cirrose e câncer. Essa doença afeta aproximadamente um a cada quatro adultos ao redor do mundo. Cada vez mais, estudos reforçam a ideia de que a dieta tem um papel central no desenvolvimento da DHGNA, não apenas pela quantidade ingerida, mas também pelo tipo de gordura consumida na dieta, incluindo as gorduras quimicamente modificadas, como as gorduras interesterificadas e *trans*, criadas pela indústria de alimentos. No estudo da DHGNA, roedores – como camundongos, ratos e hamsters – costumam ser usados para simular a doença humana. Assim, buscamos e analisamos um banco de dados onde se encontram artigos científicos, com uso de protocolo e critérios específicos, focando em trabalhos já feitos com roedores e gorduras quimicamente modificadas que tivessem como objetivo avaliar a DHGNA.

Nossa busca incluiu poucos artigos, o que revela a necessidade de se realizar mais experimentos sobre o consumo de gorduras quimicamente modificadas e o desenvolvimento de DHGNA em roedores. Estas poucas pesquisas foram analisadas e levaram a algumas conclusões, destacadas a seguir:

- A composição das dietas e o período de seu consumo precisam ser padronizados, pois variaram muito entre os estudos;
- As dietas avaliadas incluíram, além das gorduras, outros ingredientes que podem influenciar na saúde do fígado, dificultando que se saiba qual é o motivo que levou à DHGNA, alertando para a importância de um maior controle de seus itens;
- Ao se avaliar o acúmulo de gordura no fígado, os trabalhos devem utilizar mais de uma técnica, para garantir o resultado desta análise;
- Há uma necessidade crescente de se levar o gênero dos animais em conta, pois várias doenças – como a DHGNA – apresentam diferenças entre os sexos; assim, é importante que se façam mais estudos com roedores fêmeas.