



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Filipe Jorge Viana Nascimento

Análise morfológica do efeito da terapia de curta duração com IGF-1 sobre a esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental

Rio de Janeiro

2021

Filipe Jorge Viana Nascimento

Análise morfológica do efeito da terapia de curta duração com IGF-1 sobre a esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Coorientadora: Prof.^a Dra. Daniela Caldas de Andrade

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N244 Nascimento, Filipe Jorge Viana.

Análise morfológica do efeito da terapia de curta duração com IGF-1 sobre a esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental / Filipe Jorge Viana Nascimento. – 2021.

67 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Coorientadora: Prof.^a Dra. Daniela Caldas de Andrade

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Complicações – Teses. 2. Hepatopatia gordurosa não alcoólica – Terapia – Teses. 3. Fígado – Fisiopatologia – Teses. I. Marques, Erika Afonso Costa Cortez. II. Andrade, Daniela Caldas de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.36

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Filipe Jorge Viana Nascimento

Análise morfológica do efeito da terapia de curta duração com IGF-1 sobre a esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de setembro de 2021.

Orientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Daniela Caldas de Andrade
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia-Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Rafaelle Cavalcante de Lira
Universidade Federal de Campina Grande

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus; tenho muita gratidão por tudo em minha vida, repleta de bênçãos. À minha namorada, que é meu porto seguro, quem me ouve chorar, ficar triste e sempre está presente quando mais preciso. E à minha rainha, a minha mãe, a pessoa mais especial da minha vida. Gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, sou grato por tudo que eu conquistei. Por me abençoar cada dia, me dar o dom da vida.

Sou grato pela minha família, que sempre me apoia, me dá forças e me incentiva. Pelo meu irmão Bruno que além de tudo é o meu melhor amigo, ao meu pai Hélio que sempre me deu forças. E, em especial, minha mãe, meu tudo, razão do meu viver e a todo momento ela orar por mim, me apoia, é a minha base.

Agradeço à Prof.^a Dra. Erika Cortez por acreditar e confiar em mim, ter me dado a oportunidade de ser a minha orientadora e sempre me auxiliar quando eu precisei. A minha coorientadora Prof.^a Dra. Daniela Caldas e o Doutorando Thiago Freire por me ajudarem nos experimentos, me acompanhando, auxiliando, me guiando e sempre com palavras sábias que me traziam novos conhecimentos.

Sou grato à Prof.^a Dra. Laís de Carvalho por abrir as portas do laboratório para mim, me acolher, me ajudar e me incentivar a sempre continuar.

Deixo, também, meu agradecimento às Professoras do LPCT, Alessandra Thole, Ana Carolina Stumbo e Simone Carvalho.

Por todos do Laboratório de Pesquisa em Células-tronco (LPCT), essa família que me acolheu de braços abertos, e me fez sentir parte deles durante todos esses anos. Com muitos momentos de aprendizado, conhecimento, experiências e momentos divertidos e marcantes.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia da UERJ, Ana Lúcia Rosa Nascimento, Josefa da Silva Alves e Kátia Lima obrigado pelo suporte imprescindível à realização dos experimentos.

Agradeço aos meus amigos próximos, que nunca deixaram de acreditar em mim e me apoiar, continuamente me incentivando, me dando forças quando nem eu acreditava mais em mim. Amo todos vocês.

Por último, mas não menos importante, à minha namorada Ohanna, meu porto seguro, quem me abraça e é meu refúgio quando tudo está desmoronando. Me ouve, me aconselha, me apoia, me incentiva e me ama do jeito que eu sou. Te amo!!

É sempre recomendável perceber claramente a nossa ignorância.

Charles Darwin.

RESUMO

NASCIMENTO, Filipe Jorge Viana. **Análise morfológica do efeito da terapia de curta duração com IGF-1 sobre a esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental.** 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) é a principal causa de doença crônica do fígado no mundo atualmente, estando fortemente associada com a obesidade. O acúmulo de gordura no fígado (esteatose) desencadeia um processo inflamatório gerado pela lipotoxicidade e glicotoxicidade, levando à lesão celular e morte de hepatócitos. Dessa forma, a ativação de células residentes do fígado acarreta a deposição de matriz extracelular, principalmente colágeno, induzindo a fibrogênese e, a longo prazo, a disfunção hepática. O IGF-1 é um hormônio cujos níveis séricos estão diminuídos na doença hepática crônica. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial da terapia de curta duração com IGF-1 na DHGNA relacionada à obesidade induzida por dieta ocidental. Para isso, camundongos *Swiss* machos de 21 dias foram divididos em grupo controle (GC, N=8), alimentado com dieta padrão, e grupo obeso (GO, N=16), alimentado com dieta ocidental, rica em gordura saturada e carboidratos simples, por 12 semanas. Na 11ª semana, parte dos animais do grupo obeso (N=8) recebeu uma injeção subcutânea diária de IGF-1 recombinante humano (100µg/Kg/dia) por sete dias consecutivos (GO+IGF-1). Os outros camundongos receberam solução salina como controle. Nossos dados demonstraram que o tratamento de apenas uma semana com IGF-1 foi capaz de melhorar parâmetros biométricos e metabólicos relacionados à obesidade. Além disso, promoveu a recuperação do parênquima hepático, diminuindo a esteatose e a fibrose, demonstrando, assim, ação hepatoprotetora importante.

Palavras-chave: obesidade; fígado; doença hepática gordurosa não-alcoólica; fibrose. IGF-1.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Filipe Jorge Viana. *Morphological analysis of short-term IGF-1 therapy effect on liver steatosis and fibrosis in an experimental model of Western diet-induced obesity*. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is currently the main cause of chronic liver disease in the world, being strongly associated with obesity. Liver fat accumulation (steatosis) triggers an inflammatory process generated by lipotoxicity and glycototoxicity, leading to cell damage and hepatocytes death. Thus, the activation of resident liver cells leads to extracellular matrix deposition, mainly collagen, inducing fibrogenesis and, in the long term, liver dysfunction. IGF-1 is a hormone which serum levels are decreased in chronic liver disease. Therefore, the present study aimed to evaluate IGF-1 short-period therapy in NAFLD related to Western diet-induced obesity. For this purpose, 21-day-old male Swiss mice were divided into control group (CG, N=8), fed a standard diet, and obese group (GO, N=16), fed a Western diet, rich in saturated fat and simple carbohydrates, for 12 weeks. In the 11th week, part of the animals in the obese group (N=8) received a daily subcutaneous injection of recombinant human IGF-1 (100µg/kg/day) for seven consecutive days (GO+IGF-1). The other mice received saline solution as a control. Our data demonstrated that treatment as short as one week with IGF-1 was able to improve obesity-related biometric and metabolic parameters. In addition, it promoted the recovery of liver parenchyma, reducing steatosis and fibrosis, thus demonstrating an important hepatoprotective action.

Keywords: obesity; liver; non-alcoholic fatty liver disease; fibrosis; IGF-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dados da obesidade.....	17
Figura 2 -	Estrutura do lóbulo hepático.....	21
Figura 3 -	Anatomia microscopia do fígado humano e seus componentes.....	23
Figura 4 -	Fisiopatologia orientada pela obesidade da DHGNA.....	26
Figura 5 -	Papel multifacetado da célula estrelada hepática.....	27
Figura 6 -	Os diferentes tipos de células-tronco isoladas de diferentes tecidos diferenciando em hepatócitos.....	29
Figura 7 -	Fator de crescimento semelhante à insulina e vias de sinalização...	31
Figura 8 -	Funções e regulações do IGF-1 tanto na reserva hepática normal quanto na reduzida.....	33
Figura 9 -	Desenho experimental.....	38
Gráfico 1 -	Evolução do consumo calórico (Kcal) de camundongos Swiss submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO) ($p < 0,0001$)	42
Gráfico 2 -	Evolução do consumo em gramas de ração de camundongos Swiss submetidos à dieta.....	42
Gráfico 3 -	Evolução da massa.....	43
Gráfico 4 -	Massa corporal final.....	43
Gráfico 5 -	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose.....	45
Gráfico 6 -	Estimativa da esteatose hepática.....	46
Figura 10 -	Fotomicrografias de cortes histológicos dos fígados corados com hematoxilina e eosina	47
Gráfico 7 -	Análise quantitativa da esteatose hepática.....	48
Figura 11 -	Fotomicrografias de cortes histológicos dos fígados corados com Picro-Sirius Red, que mostram a distribuição de colágeno em vermelho. Aumento de 400X	49
Gráfico 8 -	Análise quantitativa da fibrose hepática.....	50
Figura 12 -	Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado imunomarcados com o anticorpo específico para alfa-actina de músculo liso, mostrando a sua marcação em castanho (setas) e núcleos contra-corados com hematoxilina, em roxo	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal e risco de doença.....	19
Tabela 2 -	Parâmetros biométricos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AKT	Serina treonina proteína quinase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CHE	Célula estrelada hepática
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
ELK1	Fator de transcrição do ETS
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ES	Esteatose simples
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GH	Hormônio do crescimento
Grb2	Fator de crescimento da proteína ligada ao receptor 2
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFBP	Proteína ligante de IGF
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IRS	Substrato receptor de insulina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
TIMPs	Inibidor específico de metaloproteinase tecidual
TITG	Teste intraperitoneal de tolerância a glicose
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
US\$	Dolar
Kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
\geq	Maior que
\pm	Mais ou menos
μ g	Picrograma
μ l	Pico litro
Kcal	Quilocaloria
Cm	Centímetro
g	Gramma
U _I	Unidade universal
ml	Milímetro
°C	Grau Celsius
mMol	Milimole
L	Litro
rpm	Rotação por minuto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	Obesidade	16
1.2	Fígado	19
1.3	Fisiopatologia da obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e fibrose hepática	24
1.4	Terapia celular e com fatores celulares para doenças hepáticas	28
1.5	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1)	30
1.6	IGF-1 e DHGNA	32
2	JUSTIFICATIVA	35
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivos gerais	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Animais e modelo experimental	37
4.2	Consumo alimentar em gramas e em calorias	38
4.3	Parâmetros biométricos	38
4.4	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose	39
4.5	Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina e Homa IR	39
4.6	Processamento histológico	40
4.7	Análise qualitativa e quantitativa da esteatose hepática	40
4.8	Análise qualitativa e quantitativa da fibrose hepática	40
4.9	Imunomarcção	41
4.10	Análises estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Consumo alimentar	42
5.2	Parâmetro biométrico	43
5.3	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose	44
5.4	Análise da esteatose hepática	45
5.5	Análise da fibrose hepática	48

5.6	Análise da expressão de alfa actina de músculo liso	50
6	DISCUSSÃO.....	52
	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

Devido à crescente prevalência de obesidade, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma das principais comorbidades associadas à obesidade, é hoje reconhecida como a causa mais comum de doença hepática crônica, com uma prevalência global estimada de 25 a 30%, chegando a 90% em pacientes com obesidade mórbida.

Se não tratada, a DHGNA pode evoluir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular. A lipotoxicidade e a glicotoxicidade, dois processos que começam com a exposição dos hepatócitos a níveis elevados de lipídeos e carboidratos, respectivamente, desempenham papéis centrais na fisiopatologia da doença.

Diversas células participam desse processo, dentre as quais podem ser listadas as células residentes: células de Kupffer, células sinusoidais hepáticas e células estreladas hepáticas (CEH); além das células inflamatórias recrutadas por sinais pró-inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas, dentre outros. Os hepatócitos são afetados por estas moléculas, o que contribui para ativação da apoptose, acarretando alterações morfológicas e fisiológicas.

Ao se tornarem ativas, as CEH proliferam e passam a sintetizar e secretar colágeno, além de outros componentes da matriz extracelular (MEC). Nesta condição, as CEH expressam α -actina de músculo liso, um marcador de miofibroblastos. As células inflamatórias ativadas, incluindo as células de Kupffer, são responsáveis pela ativação das CEH e fibroblastos portais por meio da secreção das citocinas TGF- β , IL-1 e TNF- α (fator de crescimento transformante-beta, interleucina – 1 e fator de necrose tumoral – alfa, respectivamente).

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) é um hormônio de crescimento anabólico de função endócrina, parácrina e autócrina, associado com proliferação, crescimento e metabolismo celular. O hormônio de crescimento (GH) estimula a síntese de IGF-1 pelo fígado, responsável por 75% do IGF-1 circulante. Os 25% restantes da produção são divididos por diferentes órgãos. Da mesma forma, o IGF-1 regula a liberação do GH por feedback negativo.

Na doença hepática crônica, os níveis de IGF-1 estão diminuídos, e seus níveis circulantes se correlacionam com a extensão da disfunção hepatocelular. A diminuição do IGF-1 na doença hepática é causada, em parte, pelo declínio da produção hepática, e o nível de IGF-1 está fortemente correlacionado a indicadores da função hepática, como aspartato aminotransferase sérica, bilirrubina, fosfatases alcalinas e albumina.

A administração de terapia hormonal para elevar os baixos níveis de IGF-1 a uma faixa normal é intuitivamente relevante. Fiore e colaboradores (2015) demonstraram que o transplante de células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas para expressar IGF-1, em camundongos, melhora a fibrose hepática induzida por tioacetamida. Esse efeito foi associado à redução da ativação de CEH. Sabe-se que as células de Kupffer e as CEH expressam o receptor de IGF-1.

Atualmente, o único tratamento efetivo disponível para a cirrose é o transplante de fígado. Entretanto, a carência de órgãos, dentre outros fatores, limita esse tratamento e leva à necessidade iminente do desenvolvimento de novas terapias antifibróticas. Nosso grupo tem demonstrado, ao longo da última década, o efeito benéfico do transplante de células-tronco na regeneração hepática (D. C. Andrade et al., 2020; D. C. Andrade et al., 2015; S. Carvalho et al., 2008; S. N. Carvalho et al., 2010; S. N. Carvalho et al., 2013; Pinheiro et al., 2017, 2019, 2021). Um dos potenciais mecanismos de ação da terapia celular no fígado é a ativação parácrina das vias de sobrevivência das células atingidas e regeneração tecidual. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas torna possível a concepção de terapias que eliminem a utilização de células e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais. Sabe-se que o IGF-1 é um dos fatores de crescimento secretados pelas células-tronco e de extrema importância na fisiopatologia da DHGNA. Assim a relevância deste projeto baseia-se na avaliação do potencial terapêutico do IGF-1 na DHGNA relacionada à obesidade induzida por dieta ocidental.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Obesidade

A obesidade é, hoje, considerada um dos mais graves problemas de saúde pública do século XXI, atingindo tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Apresenta caráter multiétnico e afeta tanto homens quanto mulheres, gerando custos econômicos altíssimos (Smith & Smith, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é um distúrbio do estado nutricional caracterizada por um desbalanço energético entre a ingestão e o gasto de calorias, acarretando aumento da massa corporal e suas complicações. Possui características multifatoriais e sua etiologia é complexa, resultando da interação de características ambientais, genéticas, metabólicas, psicossociais, comportamentais e culturais, entre outras (Res et al., 2020). Desse modo, devido a sua complexidade fisiopatológica, o desenvolvimento de métodos terapêuticos que sejam bem eficazes se torna mais difícil (Gadde et al., 2018; Wannmacher, 2016).

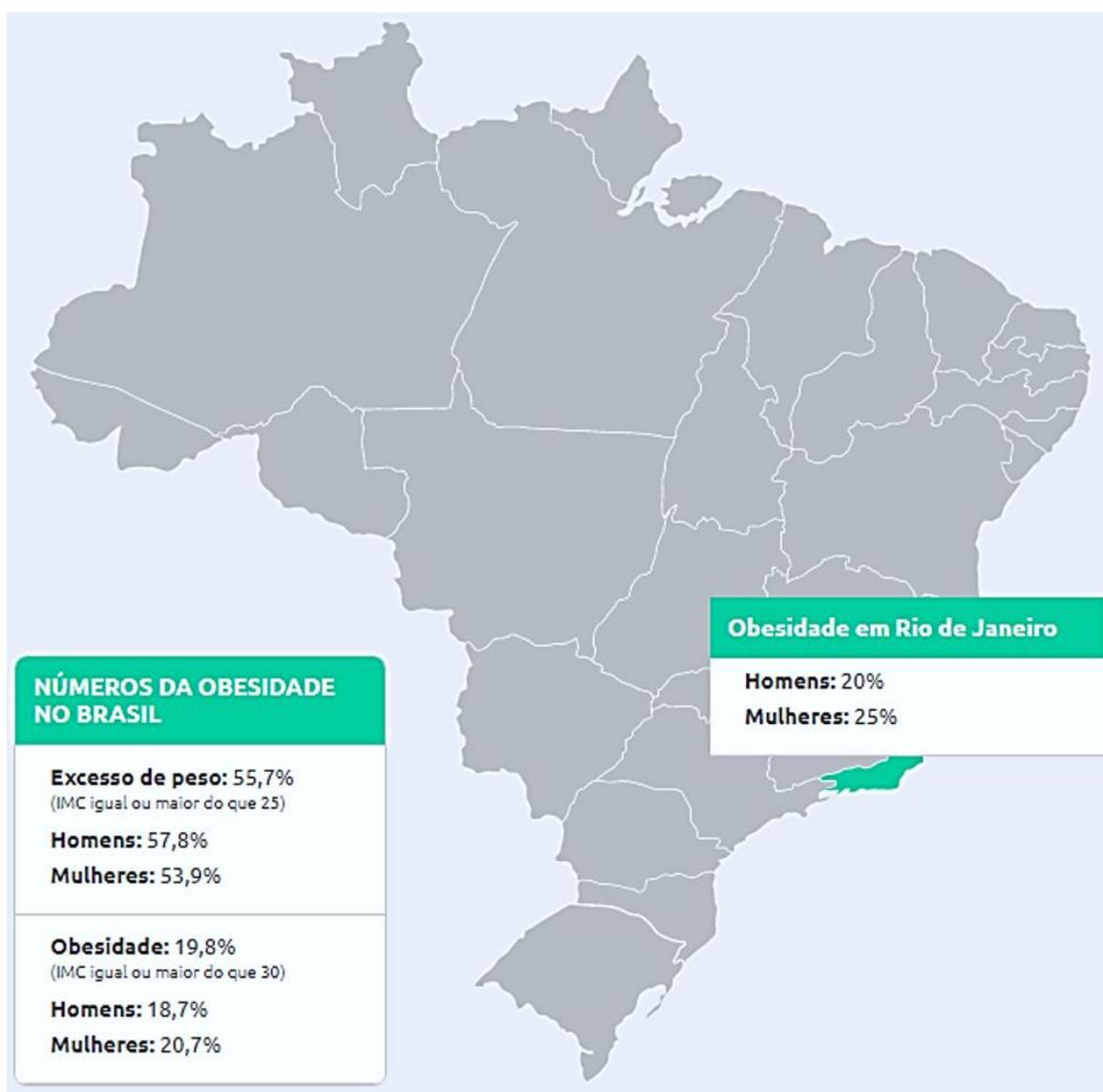
Atualmente, a obesidade é a segunda principal causa de morte prematura no mundo. A prevalência mundial da obesidade quase dobrou entre 1980 e 2016 (Who 2017). Estima-se que 38,9% dos adultos apresentem excesso de peso. Assim, mais de meio bilhão de adultos em todo o mundo são classificados como obesos (Bentham et al., 2017). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, mais de 55% da população está com sobrepeso sendo, aproximadamente, 20% obesos (ABESO, 2016). A OMS estimou que, conforme os dados atuais, 2,3 bilhões de adultos no mundo estarão acima do peso em 2025, sendo 700 milhões de pessoas com obesidade, ou seja, com um índice de massa corporal (IMC) acima de 30 (Tabela 1) (Bentham et al., 2017).

Durante o ciclo da vida, a alimentação saudável e a atividade física estão entre os principais fatores responsáveis pela promoção e manutenção da saúde. O comportamento alimentar é reflexo da interação de fatores fisiológicos, genéticos, psicológicos e das condições ambientais e sociais. No que se refere ao contexto socioeconômico, a mudança na produção de alimentos observada nas últimas

décadas, em consequência da transição tecnológica, contribuiu para alterações no perfil alimentar da população, descritas por Popkin (Barry M. Popkin, 2011) e denominadas, coletivamente, como transição nutricional.

Segundo o Ministério da Saúde, os padrões de alimentação, na maioria dos países, estão mudando, as pessoas estão diminuindo o consumo de alimentos considerados *in natura* – minimamente processados de origem vegetal – e aumentando a ingestão de produtos industrializados prontos para consumo causando, principalmente, desequilíbrio na oferta de nutrientes e ingestão excessiva de calorias (Saúde, 2020).

Figura 1: Dados obesidade no Brasil.



Fonte: Adaptado de <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>, acesso em 15/02/2021

O crescente aumento do peso corporal que, conseqüentemente, leva à obesidade, pode atuar como um desencadeador de outras patologias relacionadas, tais como: doenças hepáticas, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, asma, osteoartrite e câncer, que são consideradas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) (OECD, 2019; Porto et al., 2019). No Brasil, as DCNT concentraram um total de 74% das mortes em 2016, segundo os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde. Essas morbidades são caracterizadas por terem origem não-infecciosa, longos períodos de latência e estarem relacionadas à incapacidade funcional, comprometendo a saúde da população. Portanto, esses dados são preocupantes, visto que a obesidade é um fator desencadeador importante no desenvolvimento dessas doenças, gerando altas taxas de morbidade e mortalidade, com impacto na qualidade de vida física e/ou mental do indivíduo (Brasil, 2019).

As doenças agudas e crônicas associadas com o excesso de adiposidade, não somente afetam negativamente a qualidade de vida do indivíduo, mas também aumentam substancialmente os custos para o sistema de saúde, além de diminuir a produtividade do indivíduo e da sociedade (Paes Da Silva et al., 2006). No mundo, estima-se que, aproximadamente, US\$ 2 trilhões ou 2,8% do PIB global dos gastos anuais estão relacionados com a obesidade (Richard et al., 2014). No Brasil, o impacto na obesidade é de 5% do PIB (Dobbs, R.; Sawers, C.; Thmpson, F.; Manyika, J.; Woetzel, J.; Child, 2014).

O diagnóstico de excesso de peso corporal ou obesidade, segundo a OMS, utiliza o Índice de Massa Corporal (IMC) como parâmetro, que serve para avaliar a adiposidade corporal através da relação entre peso e altura, onde divide-se o peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medida em metros ($=\text{kg}/\text{m}^2$). Assim, se o resultado aferido do IMC for maior ou igual a 25 é caracterizado por excesso de peso, e se o resultado for maior ou igual a 30 é caracterizado como obesidade, sendo que esta pode ser enquadrada em 3 categorias diferentes, como mostrado na tabela 1. Entretanto, o IMC pode variar dependendo de alguns fatores como etnia, idade, estilo de vida (sedentários vs. atletas) etc (ABESO, 2016; Dias et al.,) 2017).

Tabela 1: Classificação internacional da obesidade segundo o índice de massa corporal e risco de doença

IMC (KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
30-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO

A gordura visceral está relacionada com patologias hepáticas, com a prevalência do fígado gorduroso ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Cury et al., 2021). No entanto, o IMC, como resultado único, não se encaixa em um diagnóstico preciso; logo, outras medidas foram testadas para auxiliar no diagnóstico da obesidade. Com isso, depois de alguns anos, foi adotado pela OMS e centros médicos brasileiros o uso da medição da circunferência abdominal. Esse parâmetro avalia bem a gordura visceral e a gordura total. Assim, relacionando a circunferência abdominal e gordura corporal, quanto maiores esses parâmetros, maiores são os riscos de fatores cardiovasculares adversos, sendo os valores de corte ≥ 94 cm em homens e ≥ 80 cm em mulheres, diferenciando em alguns grupos étnicos como asiáticos e indianos (ABESO, 2016).

1.2. Fígado

O fígado, anatomicamente, é a maior glândula do corpo humano e, também, a maior massa volumosa da víscera abdominal, pesando cerca de 1,5kg. Está

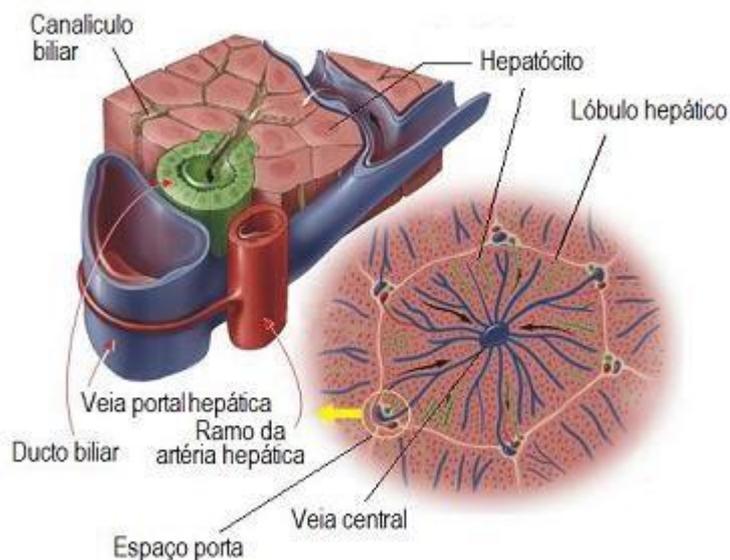
localizado na região superior à direita do abdômen, logo abaixo do diafragma. O fígado desempenha diversas funções metabólicas, como o processamento e armazenamento de nutrientes absorvidos no trato digestivo, neutralização e eliminação de substâncias (Junqueira & Carneiro, 2013). É uma glândula mista, que libera na corrente sanguínea numerosos hormônios e proteínas de grande importância fisiológica que compõem a secreção endócrina do fígado. Por outro lado, a bile, liberada no lúmen duodenal, forma a sua secreção exócrina (Gartner & Hiatt, 2014)

Desse modo, o fígado é a interface entre o sistema digestório e o sangue, possuindo uma posição importante no sistema circulatório para atuar nos processos metabólicos. Seu aporte sanguíneo é oriundo, em grande parte, da veia porta (70%-80%), transportando o sangue pouco oxigenado, porém, rico em nutrientes provenientes das vísceras abdominais, enquanto o restante deriva da artéria hepática, fornecendo sangue rico em oxigênio (Kierszenbaum, 2008).

O fígado é revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo contendo fibras de colágeno e elastina, sendo recoberta pelo peritônio. A região onde essa cápsula se torna mais espessa é denominada de hilo, local por onde a artéria hepática e a veia porta penetram no fígado e por onde saem os ductos biliares, assim como os linfáticos. Essas estruturas são circundadas por uma camada de tecido conjuntivo rico em colágeno (Fallis, 2006).

O parênquima hepático é organizado em lóbulos poligonais. O lóbulo hepático é a unidade estrutural do fígado, onde o componente celular básico é o hepatócito, a unidade funcional. Cada lóbulo hepático clássico é constituído por placas de hepatócitos anastomosadas, delimitadas por capilares sinusoidais, dispostos radialmente em direção à veia centrolobular ou central. Nos vértices dos lóbulos encontram-se os espaços porta, cada um contendo uma tríade portal, normalmente constituída por um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um ramo do ducto biliar (Figura 2). No espaço porta também estão vasos linfáticos, nervos, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo abundante (Ross, 2016).

Figura 2: Estrutura do lóbulo hepático



Adaptado de <http://etudocienciadb.blogspot.com/2010/08/celulas-hepaticas.html>, acessado em 25/09/2020

O hepatócito é uma célula versátil, possuindo um papel central no metabolismo de quase todos os nutrientes da digestão, sendo responsável por convertê-los em produtos de armazenamento, como o glicogênio. Além disso, é uma célula com função endócrina atuando na produção, acúmulo e transporte de diversas substâncias endógenas. Atua detoxificando e neutralizando diversas substâncias, sendo responsável também por regular e ativar células imunes. Sua função exócrina é representada pela secreção da bile, que desempenha papel importante na emulsificação de lipídios no trato digestivo (Ross, 2016).

Essas células têm formato poligonal cuboide, e estão dispostas bem próximas umas das outras, formando placas interconectadas. Apresentam uma grande quantidade de mitocôndrias devido a sua alta atividade celular, conseqüentemente, possuindo o retículo endoplasmático rugoso e liso bem desenvolvidos, atuando ambos nos processos metabólicos dos nutrientes, assim como um complexo de Golgi proeminente (Junqueira & Carneiro, 2013).

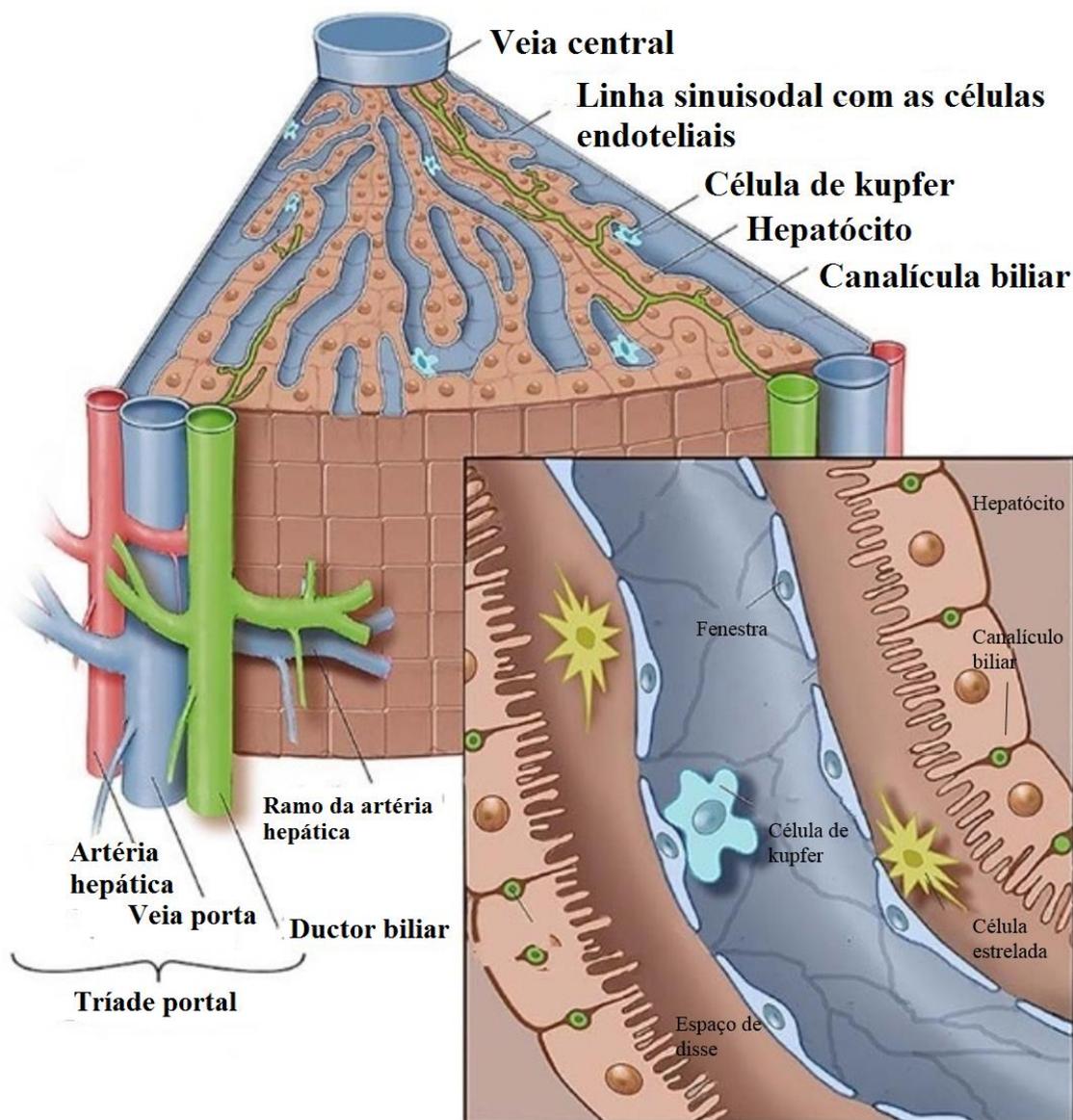
As placas de hepatócitos são formadas por fileiras simples, e nas regiões de contato entre os hepatócitos vizinhos, as membranas celulares estão conectadas firmemente por junções do tipo oclusivas, apresentando também, junções do tipo gap importantes na comunicação intercelular. A união dessas células é delimitada

por um espaço tubular comum conhecido como canalículo biliar, constituindo a primeira porção de vias biliares. Estas, formam uma rede complexa que se anastomosa progressivamente ao longo das placas do lóbulo hepático, levando até a porção terminal no ducto biliar, também chamado de canal de Hering. Dessa forma, a bile flui progressivamente na direção contrária do sangue, do centro do lóbulo para a sua periferia. Na periferia, a bile adentra os ductos biliares localizados no espaço porta (Gartner & Hiatt, 2014).

Entre as fileiras de hepatócitos encontram-se os capilares sinusoides. As células endoteliais que revestem os sinusoides são finas e com poros, sendo separadas dos hepatócitos adjacentes por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial conhecido como espaço de Disse. Os hepatócitos possuem microvilosidades em sua face voltada para os sinusoides, fazendo com que aumente a superfície de contato com as células endoteliais. Dessa forma, os fluidos sanguíneos percorrem pela parede endotelial fazendo um contato rente ao hepatócito; com isso, há a facilitação da troca de gases e nutrientes entre o lúmen endotelial e o hepatócito e vice-versa. Essa troca é fisiologicamente essencial, porque um elevado número de macromoléculas, como a albumina, são secretadas pelo hepatócito e direcionadas para a corrente sanguínea (Trefts et al., 2018). O fígado também é responsável pela captação e por catabolizar diversas moléculas. O sangue deixa o fígado pela veia centrolobular com baixa concentração de oxigênio e contendo metabólitos para excreção (Kierszenbaum, 2008).

Na superfície interna do sinusoide hepático residem as células de Kupffer, macrófagos residentes com papel crítico na resposta imune inata, atuando na fagocitose de patógenos e agindo como uma barreira para partículas e material imunorreativo do trato gastrointestinal através da circulação portal. Essas células possuem funções específicas atuando no metabolismo de eritrócitos senescentes e na digestão de hemoglobina, provenientes da circulação sistêmica (Dixon et al., 2016).

Figura 3: Anatomia microscópica do fígado humano e seus componentes



Adaptado de Anan Abu Rmilah et al, 2019.

As células estreladas hepáticas (CEH) estão presentes no espaço de Disse, e possuem uma alta plasticidade celular. No seu estado quiescente, armazenam e mobilizam vitamina A em gotículas lipídicas. As CEH exercem participação na regeneração hepática, por meio da liberação direta de citocinas e/ou ação no remodelamento dos componentes da matriz extracelular (Abu Rmilah et al., 2019). Contudo, em condições patológicas tornam-se fenotipicamente semelhantes aos miofibroblastos, passando a expressar alfa actina de músculo liso (α -SMA), produzir de colágeno, e atuar na modulação da resposta inflamatória por meio de

citocinas e quimiocinas. Dessa forma, participam nos processos que irão levar ao desencadeamento da fibrose no fígado (Senoo et al., 2017).

1.3 Fisiopatologia da Obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e fibrose hepática.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida como um acúmulo de gordura no fígado devido a desregulação do metabolismo dos ácidos graxos. O excedente de ácidos graxos provenientes da dieta é liberado no tecido adiposo subcutâneo e, juntamente com o acúmulo de triglicerídeos, promove o desbalanço na produção das substâncias sintetizadas pelos adipócitos, as adipocinas, interferindo na homeostase (Cury et al., 2021). O depósito excessivo de gordura nos adipócitos gera um estresse celular importante, levando à hipertrofia do tecido adiposo. A abundância de ácidos graxos nos adipócitos promove estresse oxidativo devido à sua lipotoxicidade, alterando o ambiente celular e causando disfunção mitocondrial com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), provocando danos oxidativos nas células e podendo levar à necrose que, por meio de agentes quimiotáticos, promove a infiltração de células inflamatórias. Esse processo desencadeia uma inflamação sistêmica de baixo grau de intensidade, porém crônica, levando ao desenvolvimento da síndrome metabólica a longo prazo (Schwabe et al, 2020; Shojaie et al., 2020).

Consequentemente, a hiperlipidemia, concentração elevada de triglicerídeos e ácidos graxos circulantes no sangue, promove acúmulo inadequado de gordura no fígado. O triglicerídeo fica depositado nos hepatócitos causando disfunção hepatocelular (Sousa & Pinho, 2009). A DHGNA inclui um espectro de alterações no tecido hepático que vai desde simples esteatose hepática (EH) à esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA). O estudo dessa doença é especialmente importante porque pode evoluir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular, havendo uma relação direta com a dislipidemia (Caligiuri et al., 2016).

A DHGNA é hoje reconhecida como a causa mais comum de doença hepática crônica, com uma prevalência global estimada de 25 a 30%, podendo estar presente

em 60% de obesos, chegando a 90% em pacientes com obesidade mórbida (Polyzos et al., 2019). A EH, ou fígado gorduroso, é uma condição histopatológica que se caracteriza por acúmulo de lipídios nos hepatócitos, excedendo de 5% a 10% do peso desse órgão; já a EHNA é caracterizada por infiltração de células inflamatórias, balonização dos hepatócitos, lesão celular e fibrose. A fisiopatologia da DHGNA e sua progressão é induzida por múltiplos fatores que incluem, mas não se restringem, à: polimorfismos genéticos específicos e modificações epigenéticas, dieta (como por exemplo, excesso de gordura e frutose), falta de atividade física, obesidade, resistência à insulina, desregulação de adipocinas, processos metabólicos relacionado aos lipídeos, lipotoxicidade, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo, disbiose da microbiota intestinal e desreguladores endócrinos (Caviglia et al., 2017; Cazanave et al., 2010).

Desse modo, todo esse processo relacionado ao acúmulo de gordura e, por conseguinte, progressão da DHGNA, está relacionado à lipotoxicidade e à glicotoxicidade, pois vão promover, combinados com a lipogênese *de novo*, o acúmulo de ácidos graxos livres, causando a hepatosteatose, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial, com consequente apoptose ou necrose dos hepatócitos, assim como um estado inflamatório por meio da ativação de células imunes residentes e quimiotaxia de células imunes circulantes (Mazzocchi et al., 2018).

Portanto, quando a obesidade não é tratada a longo prazo, a EH vai levar ao desenvolvimento da EHNA. Este processo inflamatório é parecido com a inflamação de baixo grau apresentada no tecido adiposo. O fígado apresentará um estado inflamatório do tipo M1, ou seja, desencadeará um processo pró-inflamatório (Osborn & Olefsky, 2012). Diversas células hepáticas participam desse processo, como as células de Kupfer, que atuam no processo pró-inflamatório, formação da esteatose e fibrose. Ademais, também, no recrutamento de outras células através de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), sendo responsáveis pela ativação das CEH, que geram uma resposta fibrogênica. Nessa resposta, ocorre excesso de deposição de moléculas de matriz extracelular nas regiões do espaço porta e espaço de Disse, dificultando a circulação sanguínea e a nutrição dos hepatócitos. Todo esse processo leva a danos celulares nos hepatócitos, ativando o processo de apoptose e/ou necrose e causando alterações morfológicas e

fisiológicas do fígado (Oseini & Sanyal, 2017). Concomitantemente, sinais derivados de outros órgãos, adipocinas e hipóxia contribuem ainda mais para o recrutamento de células inflamatórias, levando à disfunção hepática e potencialmente ao carcinoma hepático a longo prazo (Karanjia et al., 2016; Pinto & Rosa, 2001).

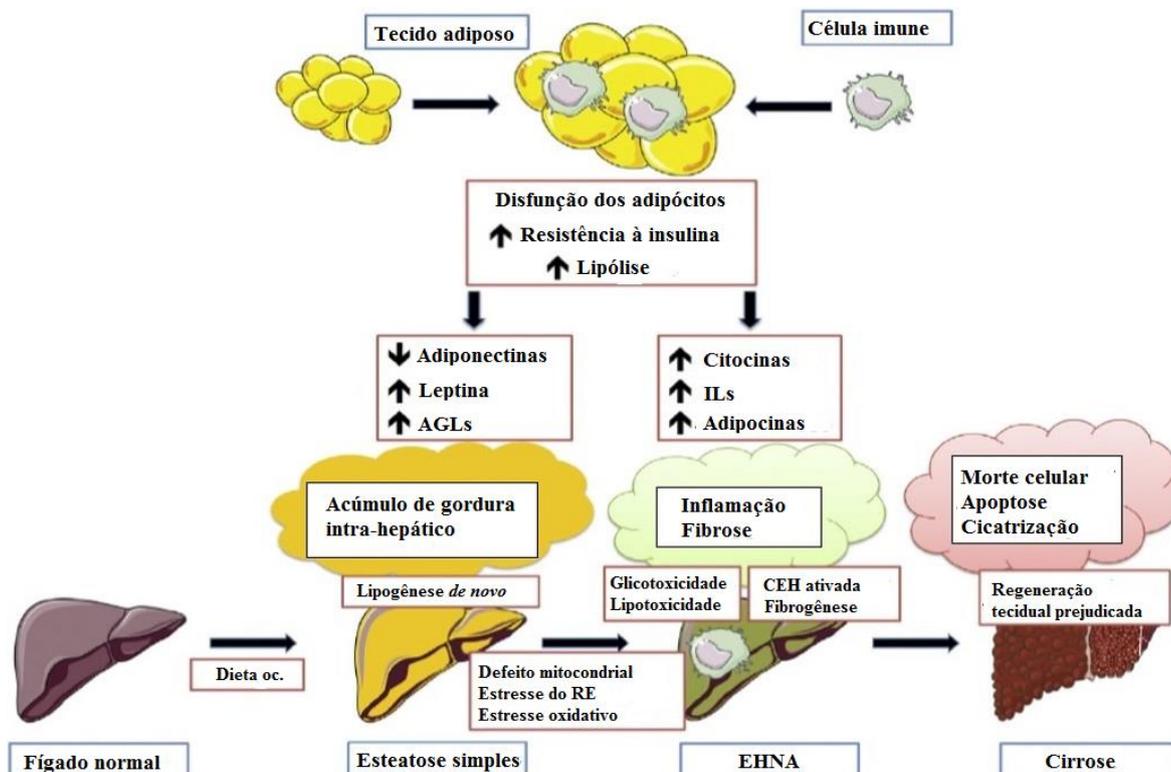
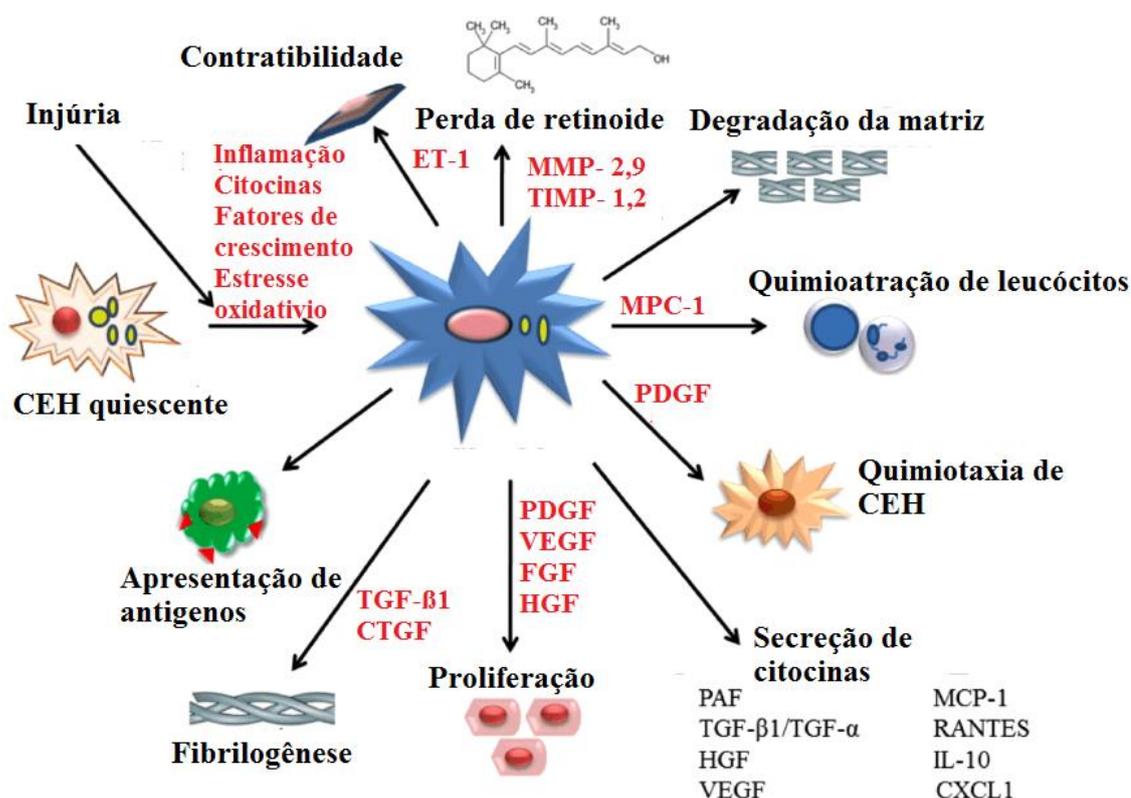


Figura 4: Fisiopatologia orientada pela obesidade da DHGNA. A expansão do tecido adiposo na obesidade diminui sua capacidade de armazenar o excesso de energia. Disfunção do adipócito e resistência à insulina são aumentadas, levando à lipólise. Consequentemente, a circulação de ácidos graxos livres e leptina aumenta, e a adiponectina diminui, resultando no acúmulo de gordura intra-hepática, ou seja, esteatose simples (ES), que é ainda mais amplificado pela alta gordura dietética e carboidratos (comumente observados na obesidade), este último aumentando lipogênese *de novo*. Após a expansão do tecido adiposo, ele também é infiltrado por células imunes que produzem citocinas e interleucinas. Quando a obesidade não é gerenciada com sucesso na fase da EH, as células imunes também se infiltram no fígado contribuindo ainda mais para um processo inflamatório intra-hepático de baixo grau, mas crônico. A lipotoxicidade e a glicotoxicidade desempenham papéis centrais tanto no desenvolvimento das ES quanto na subsequente progressão para EHNA. Defeitos mitocondriais, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo ligam a lipotoxicidade e glicotoxicidade com ES e EHNA. Quando a inflamação é prolongada, a fibrogênese começa com ativação das CEHs. O agravamento da fibrogênese que pode resultar em cirrose representa um mecanismo alterado de regeneração tecidual, durante o qual a substituição de hepatócitos submetidos à morte celular ou à apoptose não é bem-sucedida. Abreviaturas: EHNA, esteatose hepática não alcoólica; ES, esteatose simples; DHGNA, doença hepática gordurosa não alcoólica. Adaptado: Polysos et al., 2019

Como abordado, as CEH em estado normal ficam “quiescentes”, entretanto, nesse processo inflamatório, essas células são ativadas, se modificando fenotipicamente e proliferando, passando a sintetizar e secretar componentes da matriz extracelular, como o colágeno. Durante a lesão, essas células mudam seu fenótipo para miofibroblastos, passando a expressar α -actina de músculo liso e colágeno do tipo I (Grigoraş et al., 2016). Conseqüentemente, o desequilíbrio da secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e de inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs), atuantes no remodelamento hepático, contribui para a formação de fibrose. As CEH e fibroblastos portais são ativados pelas células de Kupffer por meio da secreção das citocinas TGF- β , IL-1 e TNF- α (fator de crescimento transformante-beta, interleucina – 1 e fator de necrose tumoral – alfa, respectivamente). Nesse processo, vias de sinalização, como a fosfatidilinositol -3 quinase (PI3K) e MEK/MAPK são usadas para perpetuar a ativação das CEH. Sinais para a proliferação das CEH são transduzidos por meio das vias FAK, PI3K e proteína de serina/treonina quinase (Akt). Finalmente, a expressão de colágeno tipo I é regulada pela via de sinalização PI3K-Akt (Caligiuri et al., 2016; Grigoraş et al., 2016; Roskams, 2008).

Figura 5: Papel multifacetado da célula estrelada hepática



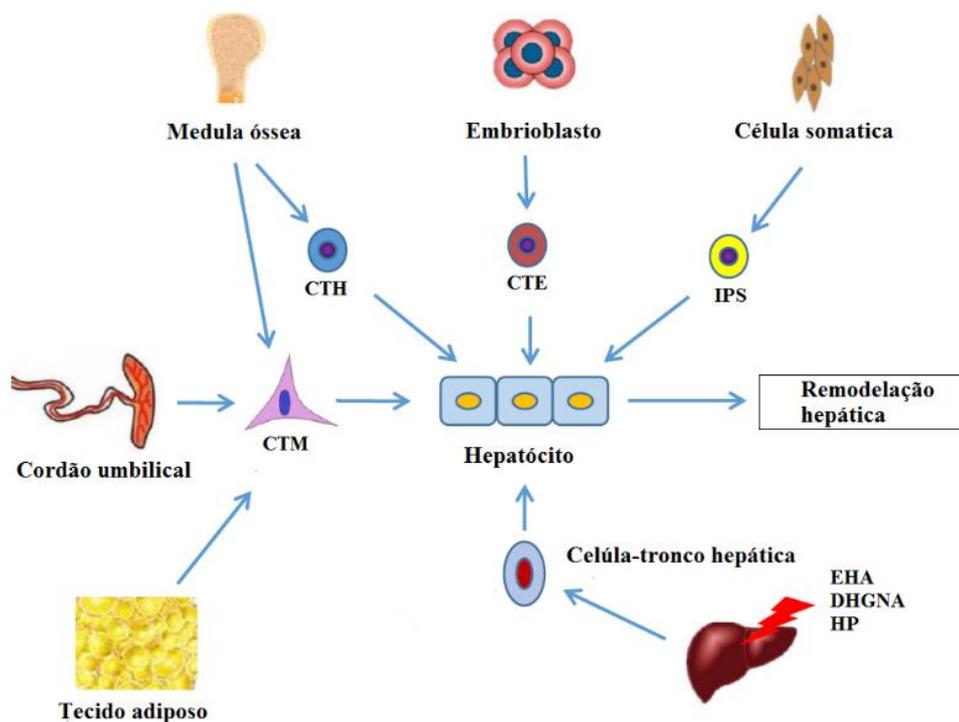
Adaptador de Adriana Grigoras et al, 2016.

1.4. Terapia celular e com fatores celulares para doenças hepáticas

A longo prazo, o processo de fibrogênese irá promover uma modificação histológica e bioquímica no fígado, resultando na cirrose (Caviglia et al., 2017). Todavia, nesse estado, os danos às células hepáticas são irreversíveis, levando à falência do órgão e consequente necessidade do transplante de fígado. Porém, o transplante somente é possível para uma pequena fração de pacientes devido à escassez de doadores de órgãos. Segundo os dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), houve uma redução de 10,8% no número de transplantes de fígados nos três primeiros trimestres de 2020, comparado com o mesmo período do ano de 2019 (Garcia, 2020). Além disso, não existem, atualmente, terapias farmacológicas aprovadas para DHGNA. Sabe-se que o fígado, antes de chegar no estado de cirrose, possui uma capacidade de regeneração celular, portanto, há a necessidade no campo da medicina regenerativa de novos alvos terapêuticos para essa patologia (Singh et al., 2017).

Com o avanço no campo da ciência e da biotecnologia, novas tecnologias e métodos científicos estão sendo abordados na área da terapia regenerativa. Desse modo, as células-tronco, suas progenies e seus produtos de secreção vêm sendo observados como um método potencial no combate de doenças, pois à medida que crescemos e envelhecemos, são elas que contribuem para a regeneração dos tecidos danificados. Sendo assim, atuam como um sistema reparador do corpo, fazendo a substituição de células ao longo de toda vida de um organismo (Barbosa, et al., 2018; Thurairajah et al., 2017).

Figura 6: Os diferentes tipos de células-tronco isoladas de diferentes tecidos diferenciando em hepatócitos



Adaptado de Yongting Zhang et al, 2018.

Nosso grupo tem demonstrado, ao longo da última década, o efeito benéfico do transplante de células-tronco na regeneração hepática (Pinheiro et al., 2019). Entretanto, sabe-se que o mecanismo de ação mais provável da terapia celular no fígado é a ativação parácrina das vias de sobrevivência das células atingidas e da regeneração tecidual. Nesse sentido, Pinheiro e colaboradores (2021) demonstrou que o tratamento com o secretoma de células-tronco mesenquimais promove a regeneração e o remodelamento do parênquima hepático, portanto, mostrando-se promissor na fibrose hepática. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas torna possível a concepção de terapias que eliminem a utilização de células e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais (Pinheiro et al., 2021). Dentre as diferentes citocinas e fatores de crescimento secretados pelas células-tronco, sabe-se que o IGF-1 é um fator importantes e de extrema relevância na fisiopatologia da DHGNA (Takahashi, 2017).

1.5. Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1)

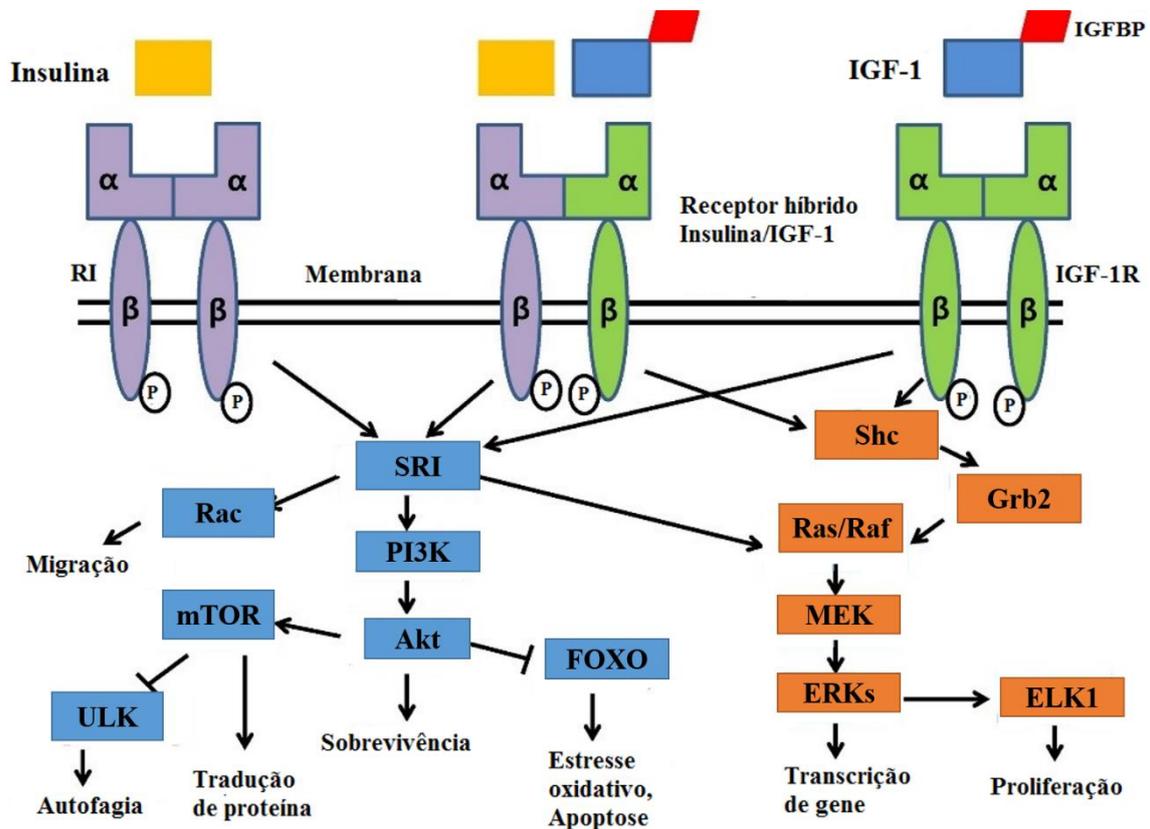
O IGF-1 é um hormônio peptídico de crescimento anabólico, relacionado com metabolismo intermediário, proliferação, crescimento e diferenciação celular. Os receptores de IGF estão presentes em diversos tipos celulares, contendo suas expressões genéticas em vários tecidos, dessa forma, permitindo ao IGF-1 ações autócrinas, parácrinas e endócrinas. A síntese do IGF-1 é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH) no fígado, e este é responsável por aproximadamente 75% de sua produção circulante, e o restante é dividido em diferentes órgãos e tecidos. Todavia, o IGF-1 participa do sistema de retroalimentação negativa na secreção do GH, atuando de forma direta na glândula pituitária ou, indiretamente, através da somatostatina e ambos atuando de forma cooperativa (Álvarez-Nava & Lanes, 2017; Chizuko Yamamuro, Jian-Kang Zhu, 2016).

Para circular na corrente sanguínea, o IGF-1 precisa estar associado ao um complexo proteico denominado proteína ligante de IGF – IGFBP. Assim, o IGF-1 é capaz de se ligar a seis formas de IGFBP 1-6, que tem por ação regular a atividade do IGF-1 nos níveis sistêmico e local (Kasprzak et al., 2017).

A insulina e o IGF-1 apresentam em sua estrutura uma considerável homologia, logo, o IGF-1 é capaz de interagir com o receptor da insulina (RI), porém, com menor grau de afinidade. É capaz de interagir, também, com o receptor híbrido IGF-1/insulina. Além disso, o IGF-1 pode se ligar ao seu receptor próprio com alta afinidade, IGF-1R, que está acoplado a duas subunidades contendo domínios tirosina quinase. Após a ativação, se inicia uma cascata complexa de sinalização intracelular por meio da ativação do receptor IGF1R1, promovendo a auto fosforilação da subunidade β intracelular do receptor e a ativação de variados substratos que, ao final, leva à ativação da ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e sua entrada no núcleo. Paralelamente, a via IRS é ativada e medeia a ativação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e a fosforilação de Akt (serina treonina proteína quinase), promovendo a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, a rapamicina em mamíferos (mTOR) (Martinelli Jr et al., 2008; Young Hee et al., 2019).

A modulação e ativação dessas duas vias são essenciais para o crescimento celular, a proliferação e o controle da sobrevivência. A via PI3K/Akt atua em sinais que estão direcionados à resposta apoptótica de Bax e Bcl-2 que, associados à caspase-9, promovem a morte celular programada (Kasprzak et al., 2017) e também regulam a autofagia por meio da ação da ULK, ambas por intermédio do fator de transcrição mTOR (Anisimov & Bartke, 2013).

Figura 7: Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e vias de sinalização da insulina



A ligação do IGF-1 ao receptor IGF-1 da membrana plasmática (IGF-1R) e do receptor híbrido IGF-1/insulina leva à autofosforilação do receptor nas subunidades intracelulares β . As proteínas de ligação IGF (IGFBPs) modulam a sinalização IGF-1. IGFBPs de alta afinidade reduzem a biodisponibilidade do ligante e, assim, impacta (indiretamente) na ativação do receptor. β -subunidades fosforiladas fornecem locais de acoplamento para o substrato do receptor de insulina (SRI), que medeia a ativação da fosfatidilinositol -3 quinase (PI3K) e fosforilação Akt. A ativação da via PI3K e Akt suporta a sobrevivência celular. Os alvos a jusante da Akt ativada incluem o alvo mamífero da rapamicina (mTOR), que promove a síntese proteica e suprime a autofagia. O acoplamento da proteína ligada ao receptor de crescimento 2 (Grb2) à subunidade β leva à fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) através do eixo da proteína quinase ativada por mitogênio (MEK). O caminho Ras/Raf é fundamental para respostas proliferativas, enquanto a ativação de Rac é importante para a migração celular. O ERK fosforilado pode se

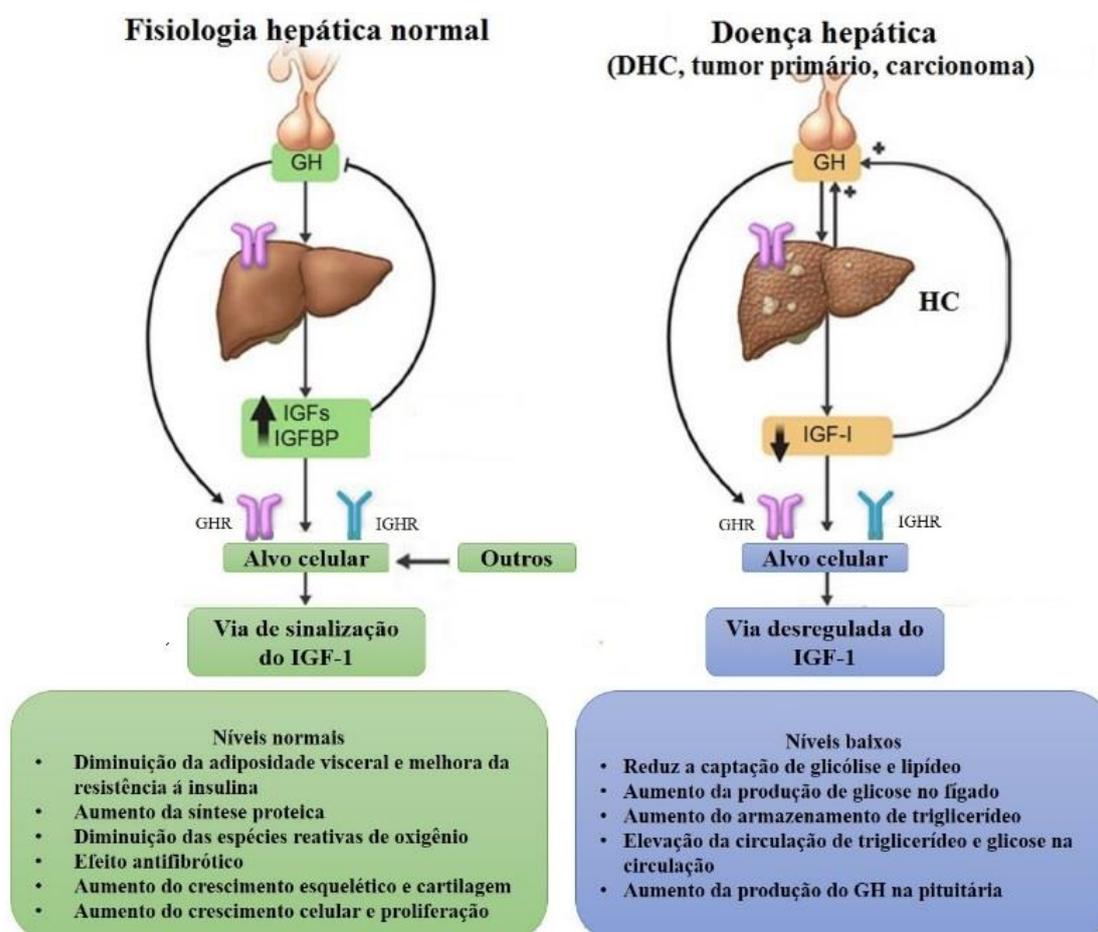
deslocar para o núcleo para regular a expressão genética. IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina 1; IGFBP proteína de ligação; Receita Federal, substrato do receptor de insulina; PI3K, fosfatidilinositol - 3 quinase; Akt, proteína de serina/threonina quinase; mTOR, alvo mamífero da rapamicina; FOXO, proteína FOX; Shc, homologia e proteína de domínio de colágeno; Grb2, fator de crescimento da proteína ligada ao receptor 2; MEK, quinase ativada por mitogênio; ELK1, fator de transcrição do ETS, Rac, pequena proteína sinalizadora. Adaptado de Wang-Soo Lee et al, 2018.

1.6. IGF-1 e DHGNA

Comparado ao GH, o IGF-1 tem uma menor concentração de receptores membranares no fígado, entretanto, mostra ter funções essenciais para o desenvolvimento e funções hepáticas. Estudos epidemiológicos demonstraram uma correlação entre níveis séricos dos componentes do IGF-1 e a extensão da função hepatocelular (Adamek & Kasprzak, 2018). Dessa forma, esse hormônio apresenta um papel importante no desenvolvimento, crescimento e regeneração da fisiologia hepática. A nível celular, suas ações atuam na regulação da progressão do ciclo celular, da proliferação e diferenciação de hepatócitos (Bonfeld & Møller, 2011).

Na doença hepática crônica, os níveis séricos dos hormônios envolvidos na produção e concentração do IGF-1 estão diminuídos, promovendo a diminuição da massa hepática, baixa produção de substâncias pelo fígado, aumento da fibrose e esteatose hepática e alteração no metabolismo dos lipídios e glicose, consequentemente, levando à complicações metabólicas (Adamek & Kasprzak, 2018).

Figura 8: Funções e regulação do IGF-I tanto na reserva hepática normal quanto na reduzida



Adaptado de Reham Abdel-Wahab et al, 2015.

Desse modo, na doença hepática crônica, o IGF-1 mostra ter efeitos hepatoprotetores. Em estudos baseados em modelos animais, o IGF-1 foi capaz de promover a diminuição do estresse oxidativo, resistência à insulina, apoptose hepatocelular e fibrogênese. Hitoshi Nishizawa et, al (2012), em um modelo (Nishizawa et al., 2012) de rato com deficiências de GH (SDR), demonstrou que estes ratos apresentaram esteatose e fibrose hepática e aumento do estresse oxidativo de acordo com o fenótipo do DHGNA. Este modelo apresentou uma redução significativa de marcadores de função hepática, o aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e triglicerídeo hepático, comparado ao grupo controle. Outro trabalho utilizando camundongos C57BL / 6 que foram alimentados com dieta rica em gordura (selvagem, suplementado com GH e suplementado com IGF-1 + controle), mostrou que o grupo suplementado com IGF-1 teve níveis de ALT reduzidos, apresentou o escore de esteatose diminuído e níveis

de leptina ligeiramente menores que os controles. Assim, mostrando que o IGF-1 possui ação benéfica ao fígado (Cabrera et al., 2018).

A administração de terapia hormonal para elevar os baixos níveis de IGF-1 a uma faixa normal é intuitivamente relevante. Duas maneiras diferentes de atingir um nível mais elevado de IGF-1 circulante foram tentadas em humanos: (i) administrar GH para estimular a produção de IGF-1 através do receptor hepático de GH e (ii) suplementação com IGF-1 recombinante humano (rhIGF-1). Estudos experimentais em ratos cirróticos mostraram que a administração de baixas doses de rhIGF-1 melhora a função hepatocelular, diminui a fibrogênese hepática e diminui o dano oxidativo na cirrose experimental (Conchillo et al., 2007).

Sabe-se que as células de Kupffer e as CEH expressam o receptor de IGF-1, e evidências acumuladas sugerem que o IGF-1 exerce influência sobre essas células, regulando a inflamação hepática e a fibrose. Assim, estima-se que o IGF-1 possua um efeito antifibrótico e melhore a função hepática (Nishizawa et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Devido à crescente prevalência de obesidade, a DHGNA, uma das principais comorbidades associadas à obesidade, é hoje reconhecida como a causa mais comum de doença hepática crônica, com uma prevalência global estimada de 25 a 30%, chegando a 90% em pacientes com obesidade mórbida. O acúmulo de gordura no fígado promove danos hepáticos, variando da esteatose, cirrose até o hepatocarcinoma.

Atualmente, o único tratamento efetivo disponível para a cirrose é o transplante de fígado. Entretanto, a carência de órgãos, dentre outros fatores, limita esse tratamento e leva à necessidade iminente do desenvolvimento de novas terapias anti-fibróticas. Nosso grupo tem demonstrado, ao longo da última década, o efeito benéfico do transplante de células-tronco e, mais recentemente, da terapia com seu secretoma na regeneração hepática. Um dos potenciais mecanismos de ação da terapia celular no fígado é a ativação parácrina das vias de sobrevivência das células atingidas e regeneração tecidual. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas torna possível a concepção de terapias que eliminem a utilização de células e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais. Sabe-se que o IGF-1 é um dos principais fatores de crescimento secretados pelas células-tronco e de extrema importância na fisiopatologia da DHGNA.

Assim a relevância deste projeto baseia-se na avaliação do potencial terapêutico do IGF-1, em tratamento de curta duração, na DHGNA relacionada à obesidade induzida por dieta ocidental.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar histologicamente o potencial da terapia de curta duração com IGF-1 na esteatose e fibrose hepática em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental em camundongos Swiss machos.

3.2 Objetivos específicos

Nos animais controle e submetidos à dieta ocidental, tratados e não tratados com IGF-1, este trabalho se propôs a:

- a) Aferir os parâmetros biométricos e metabólicos indicativos de obesidade;
- b) Quantificar histologicamente a esteatose hepática;
- c) Quantificar histologicamente o desenvolvimento de fibrose hepática;
- d) Analisar histologicamente a expressão de α -actina de músculo liso (marcador de células estreladas hepáticas) no parênquima hepático;

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e modelo experimental (D. Andrade et al., 2020).

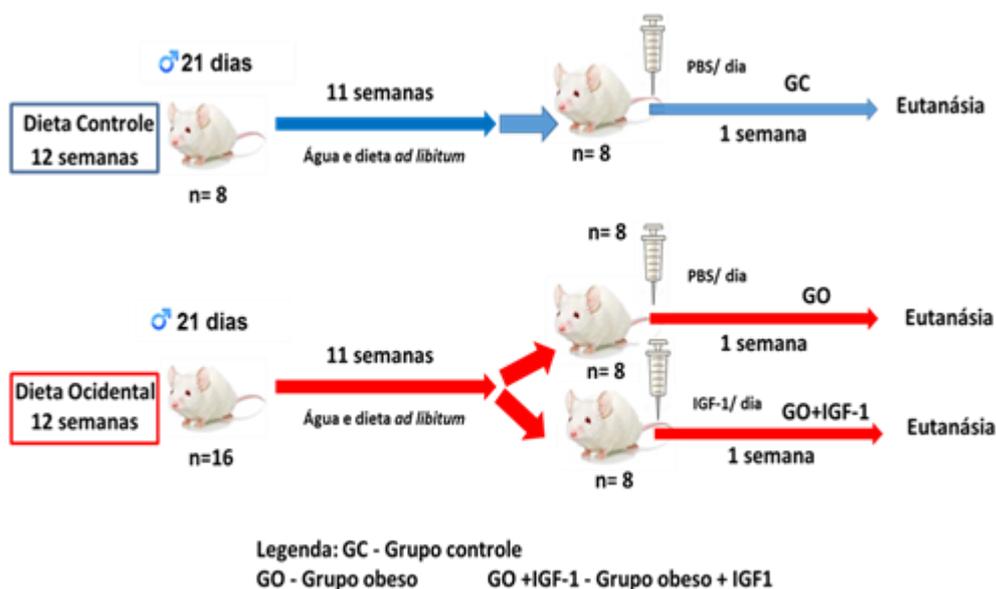
Camundongos *Swiss* machos de 21 dias de idade foram obtidos no centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Cecal/FIOCRUZ) e mantidos em caixas de polipropileno, dois animais por caixa, sob condições padrão de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($60\pm 10\%$), com ciclo de claro e escuro de 12/12h e de exaustão de ar a cada 15 min/hora. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do comitê de ética da UERJ (CEUA/026/2017).

Os animais foram divididos randomicamente em dois grandes grupos: grupo controle (GC, N=16), alimentado com ração padrão AIN93G (53,6% de carboidratos complexos, 10,0% de carboidratos simples, 20,3% de proteínas e 7,0% de lipídeos) e grupo obeso (GO, N=16), alimentado com dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gordura saturada, baseada na adição de manteiga clarificada (Ghee) (15,4% de carboidratos complexos, 34,1% de carboidratos simples, 19,8% de proteínas e 21,0% de lipídeos), conforme descrito por Tikellis e colaboradores (2008) (Tikellis et al., 2008), e já utilizada pelo nosso grupo (Neves et al., 2014; Oliveira et al., 2014). Ambas as rações foram compradas da empresa PragSoluções Ltda (Rio de Janeiro, Brazil).

A dieta foi administrada por 12 semanas, com livre acesso à água e ração. Após 11 semanas de dieta, parte dos animais do grupo obeso (N=8) recebeu uma injeção subcutânea diária de 50 μl de IGF-1 recombinante humano (100 $\mu\text{g/Kg/dia}$) (PeproTech) em solução salina por sete dias consecutivos (grupo obeso+IGF-1 - GO+IGF-1). A fim de mimetizar o estresse gerado pelas administrações de IGF-1 nos grupos correspondentes, os animais sem tratamento receberam injeções de 50 μl de solução salina.

Ao final das 12 semanas, os animais receberam anestesia utilizando Avertin®, por via intraperitoneal, numa concentração de 0,02 ml/g de massa corporal. O fígado foi retirado e dividido para a utilização em diferentes técnicas.

Figura 9: Desenho experimental



Camundongos *Swiss* machos com 21 dias foram separados em dois grupos denominados: Controle (GC - n=8) e Obeso (GO - n= 16). Após 11 semanas da dieta, os 16 camundongos do grupo obeso foram divididos em dois grupos de 8 animais cada. Os camundongos que receberam dieta ocidental foram subdivididos em grupo obeso (GO) e grupo obeso + IGF-1 (GO+IGF1). Os animais pertencentes aos grupos tratados com IGF-1 receberam uma dose diária de IGF-1 por uma semana, sendo eutanasiados no final de 12 semanas de dieta. Os animais que não foram tratados com IGF-1 receberam uma dose diária de PBS estéril por uma semana.

4.2. Consumo alimentar em gramas e em calorias

O consumo alimentar foi acompanhado durante as 12 semanas de dieta. A ingestão semanal em gramas foi estimada por meio da média da pesagem das rações em gramas realizada quatro vezes por semana, em balança analítica de precisão. A partir dos dados da ingestão em gramas, foi realizado o cálculo da ingestão em calorias (Kcal) ingeridas por semana com a seguinte fórmula: média de ração ingerida em gramas/semana x valor energético total da dieta (Kcal) /grama.

4.3. Parâmetros biométricos

Os seguintes parâmetros biométricos foram aferidos: (A) Massa corporal - os animais foram pesados semanalmente desde o nascimento; (B) Comprimento Naso-anal e comprimento da tíbia – foram aferidos com paquímetro no dia da eutanásia; (C) Índice de Lee - equivalente ao IMC em humanos, calculado a partir da fórmula: raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000; (D) Glicemia - a glicose plasmática após 6 horas de jejum foi determinada no dia da eutanásia através de glicofita (ACCU-CHEK Active); (E) Peso da gordura epididimal e retroperitoneal - o tecido adiposo foi retirado e pesado no dia da eutanásia; (F) Peso do fígado e estimativa da esteatose hepática - no dia da eutanásia, o fígado foi pesado, e, em seguida, foi feita a razão entre o peso do fígado (g) e a massa corporal (g), respectivamente.

4.4. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Após jejum de 6 horas, os camundongos receberam, por via intraperitoneal, uma injeção de glicose (1g/Kg de peso do animal) e a glicemia foi aferida no sangue coletado da veia caudal utilizando o Accu-Chek Active® (Roche Diagnostics, Germany). As amostras de sangue foram coletadas antes da injeção de glicose, caracterizando o tempo 0 (zero) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

4.5. Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina e HOMA-IR

No dia da eutanásia, após 6 horas de jejum, foi realizada a coleta do sangue em seringa contendo 20 µL de heparina sódica (5000UI/ml) e, posteriormente, transferido para um eppendorf e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separar o plasma. Em seguida, o plasma foi aliquotado e mantido a -80°C, para posterior quantificação da insulina plasmática por ELISA (ELISA Kit- Rat

Mouse Insulin, EMD Millipore, EZRMI- 13K), seguindo as recomendações do fabricante. Com o objetivo de determinar a resistência à insulina foi calculado o índice Homa-IR (Matthews et al., 1985) a partir dos valores da glicemia e insulinemia em jejum, por meio da equação: glicemia (mMol/L) x insulina (μ U/mL) / 22,5. Valores acima de 2,7 caracterizam a resistência à insulina.

4.6. Processamento histológico

Após eutanásia dos animais, os fragmentos dos fígados coletados passaram pelo fixador em paraformaldeído a 4%, foram desidratados em séries crescentes de álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Após a microtomia, cortes de 5,0 μ m foram aderidos em lâminas silanizadas.

4.7. Análise qualitativa e quantitativa da esteatose hepática

Cortes não-seriados de 5 μ m do fígado foram submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Em seguida, foram analisados em microscópio de luz (Olympus BX53, com câmera CCD Olympus DP72). As imagens foram capturadas em objetiva de 40x e analisadas no software STEPanizer pelo método da contagem de pontos: Densidade/área (μ m²). As áreas analisadas foram obtidas aleatoriamente.

4.8. Análise qualitativa e quantitativa da fibrose hepática

Cortes de 5,0 μ m do fígado foram corados com Picro-Sirius Red (solução a 0,1% de Direct Red 80, Sigma-Aldrich) por 45 min, e posteriormente analisados em microscópio de luz (Olympus BX53, com câmera Olympus DP72). As imagens

das áreas coradas em vermelho, consideradas fibróticas pelo acúmulo excessivo de colágeno, foram capturadas com objetiva de 40x e analisadas com o software Image-Pro Plus. O valor médio de 15 áreas selecionadas aleatoriamente por animal foi expresso como a porcentagem de área de fibrose.

4.9. Imunomarcação

Cortes de 5,0 μm do fígado em lâminas silanizadas foram colocados na estufa 58° C (overnight), após foram desparafinados em banhos de xilol e hidratados em banhos de concentrações decrescentes de álcool, até hidratação em água destilada. Os cortes foram banhados em peróxido de hidrogênio a 3%, depois lavados com tampão fosfato-salino - PBS e imersos em tampão citrato pH 6,0 a 60°C para recuperação antigênica dos sítios proteicos. Após lavagem com PBS, as amostras foram expostas em PBS/BSA 3% para bloqueio de sítios inespecíficos, e logo após incubadas em anticorpo primário anti- α -actina de músculo liso (mouse monoclonal – Santa Cruz®) *overnight*. Em seguida, ocorreu a incubação com anticorpo secundário biotinilado (Vectastain®, ref PK-7800, lot ZF0806) e a detecção do anticorpo foi amplificada pelo sistema biotina-estreptavidina (Vectastain®). A reação foi observada após a incubação com 3,3-diaminobenzidina – DAB (Vectastain®), e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina. Os cortes foram desidratados em banhos crescentes de álcool, diafanizados em xilol e a lâmina foi montada com Entellan (Sigma-Aldrich). As imunomarcações dos cortes de fígado foram capturadas em microscópio de luz (Olympus BX53, com câmera Olympus DP72) na objetiva de 40x.

4.10. Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) one-way e pós-teste de Holm-Sidak, usando nível de significância de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar

O consumo calórico (Kcal) apresentou-se significativamente maior a partir da 5ª semana de dieta ($p < 0,0001$) no grupo que recebeu dieta ocidental (GO) (Gráfico 1). Entretanto, não houve variação no consumo de ração em gramas entre os grupos (GC e GO), durante todo o período de dieta (Gráfico 2).

Gráfico 1: Evolução do consumo calórico (Kcal) de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO) ($p < 0,0001$)

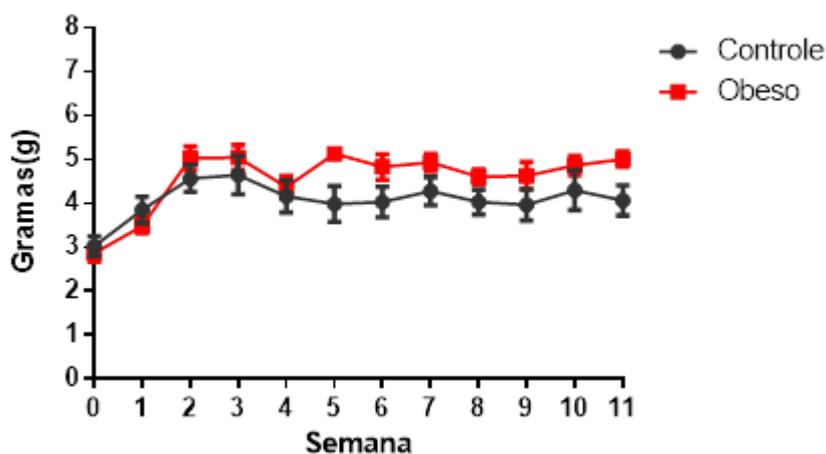
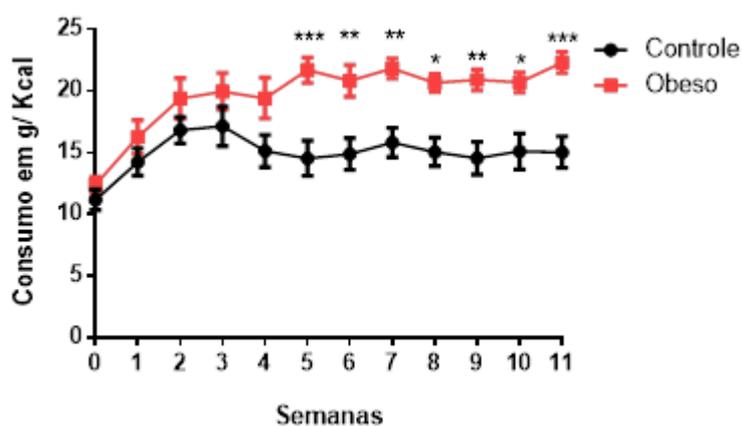


Gráfico 2: Evolução do consumo em gramas de ração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO) ($p < 0,0001$)



5.2. Parâmetros biométricos

Os grupos experimentais apresentaram diferença significativa nos parâmetros biométricos analisados (Tabela 2). O GO apresentou aumento significativo da massa corporal a partir da 5ª semana de dieta, comparado ao GC, o que se observou até o final do experimento (gráficos 3 e 4) ($p < 0,0001$). Entretanto, após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($44,33 \pm 0,65$) apresentou redução significativa da massa corporal em relação ao grupo GO ($52,4 \pm 6,23$), alcançando valores semelhantes ao GC ($44,72 \pm 1,64$) (gráfico 6).

Gráfico 3: Evolução da massa corporal de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO)

Massa corporal após o tratamento com IGF-1

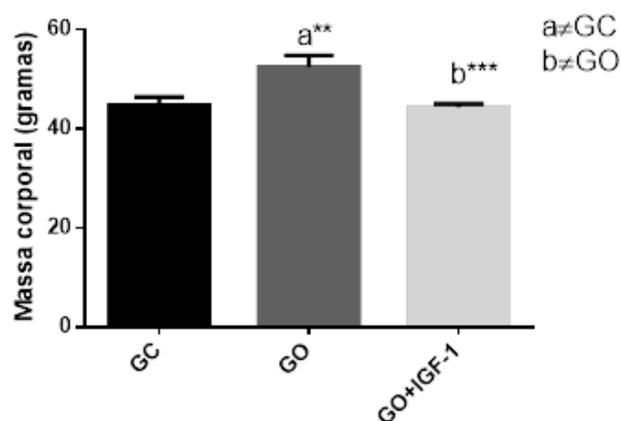
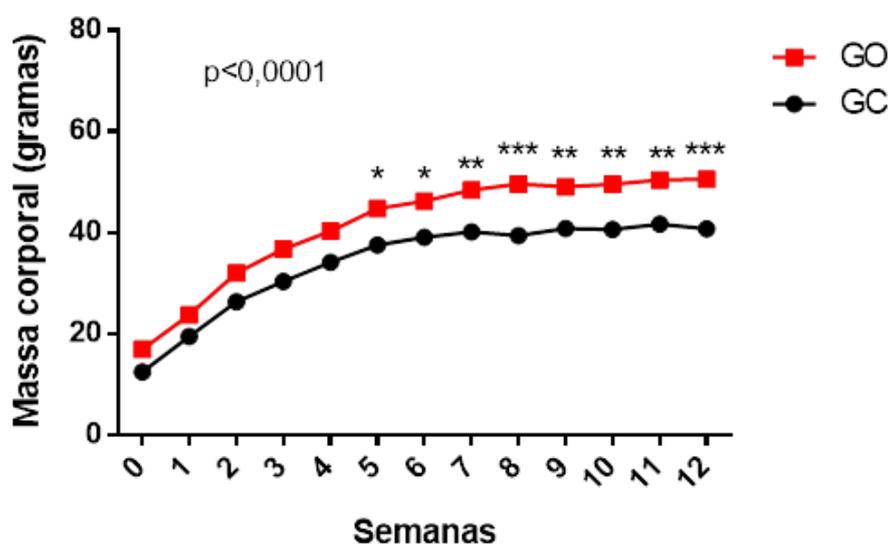


Gráfico 4: Massa corporal final. Massa corporal dos grupos tratados e não tratados com IGF-1



O GO+IGF-1 também apresentou redução significativa do índice de Lee, da gordura epididimal, da gordura retroperitoneal e da glicemia em jejum quando comparado com o grupo GO, restaurando valores próximos ao GC, com exceção da glicemia em jejum. Não houve diferença significativa do comprimento naso-anal nos grupos analisados. (Tabela 2).

Tabela 2 :Parâmetros biométricos

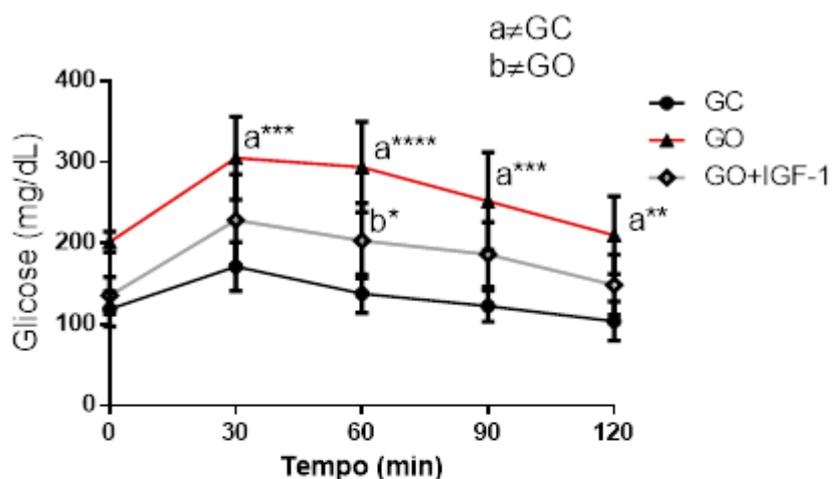
	GC	GO	GO+IGF-1
Peso corporal	44,7±1,6	52,4± 2,3^{a**}	44,3±0,6^{b***}
Comprimento Naso-anal (cm)	8,9±0,2	9,4±0,1	9,3±0,1
Índice de Lee	346,5±4,48	419,5±3,53^{a*}	318,6±13,53^{b****}
Glicemia em jejum	102,8±9,4	175,0±5,3^{a****}	139,8±9,4^{a*, b****}
Gordura Epididimal (g)	0,82±0,1	2,24±0,3^{a****}	1,32±0,1^{b**}
Gordura Retroperitoneal (g)	0,30±0,06	0,91±0,12^{a****}	0,52±0,06^{b**}

Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, glicemia em jejum, gordura epididimal e gordura retroperitoneal de camundongos tratados e não tratados com IGF-1, sendo “a” diferente de GC e “b” diferente de GO.

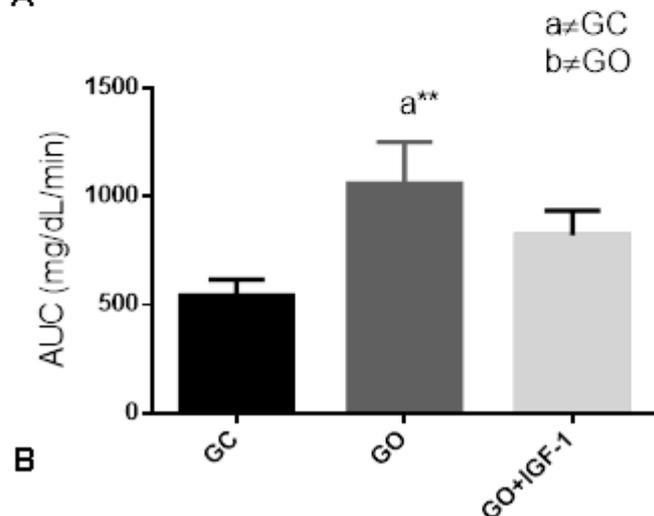
5.3. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

O GO apresentou intolerância à glicose quando comparado ao GC nos tempos analisados de 30, 60 e 90 minutos. Já o GO+IGF-1, apresentou melhora da tolerância à glicose aos 60 minutos (gráfico 5A), comparado ao GO. O gráfico da área sob a curva indicou redução significativa da tolerância à glicose no GO (1058±192,8) em relação ao GC (544±45,84) e consequente melhora no GO+IGF-1 (821,7±45,84), embora esse último dado não tenha apresentado diferença estatística (gráfico 5B).

Gráfico 5: Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (A) e Área sob a curva (B).



A



B

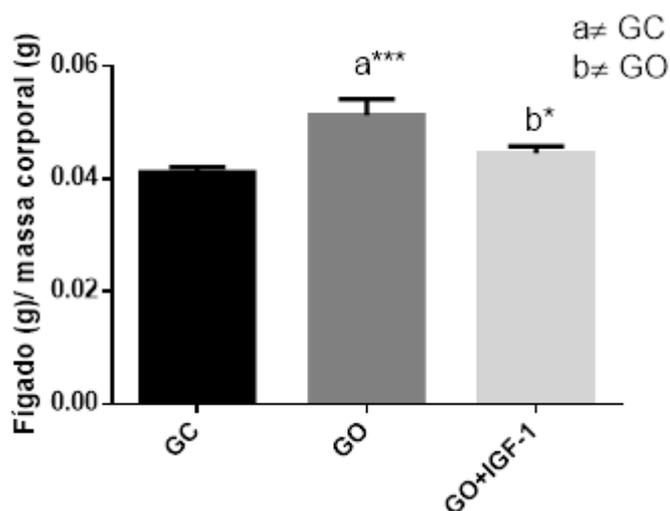
5.4 Análise da esteatose hepática

O GO ($0,051 \pm 0,0028$) apresentou aumento significativo da estimativa de esteatose hepática (gráfico 6), mensurada pela correção do peso do fígado (g) pela massa corporal (g), quando relacionado com o GC ($0,041 \pm 0,00094$). Após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($0,044 \pm 0,0012$) apresentou redução significativa de 13% da estimativa de esteatose hepática em relação ao grupo GO.

A análise em microscopia de luz de seções do fígado coradas por hematoxilina e eosina (Figura 10) mostrou que o fígado do GO apresenta parênquima hepático com intenso grau de esteatose. Observamos tanto esteatose macrovesicular (grandes vacúolos dentro de cada hepatócito, tornando o núcleo

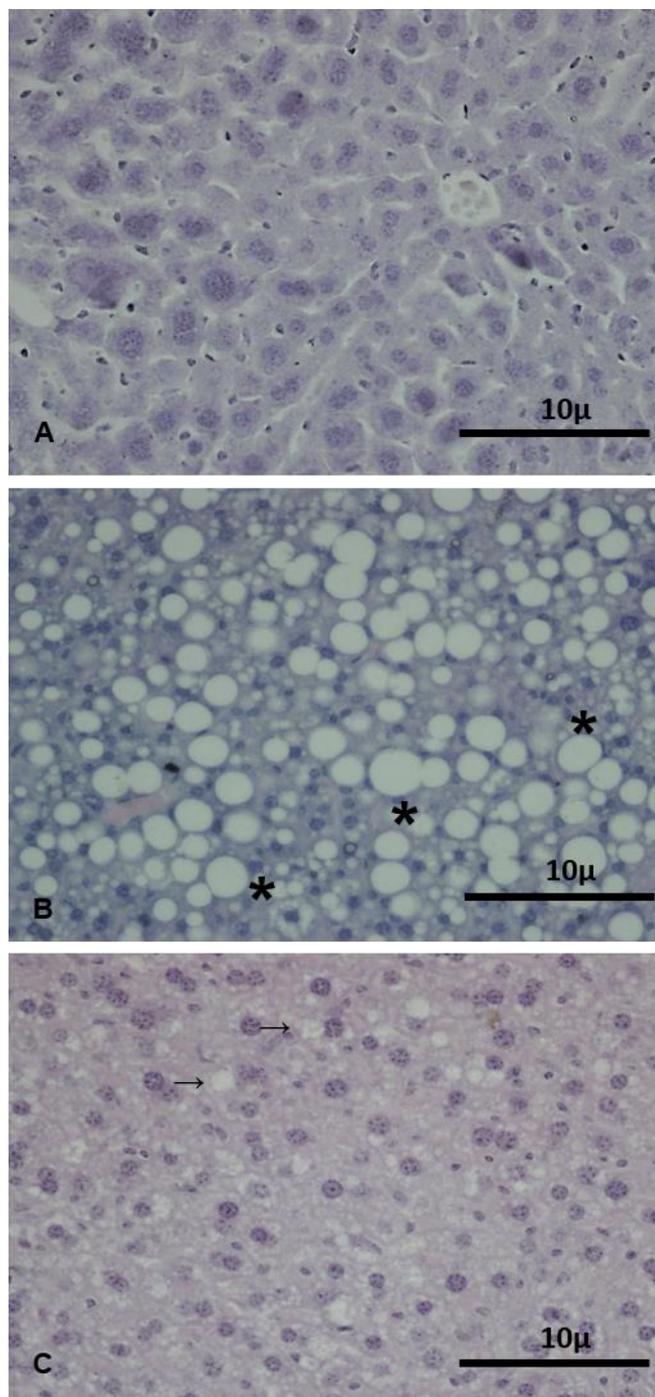
excêntrico), como a microvesicular (inúmeros vacúolos dentro de cada célula, e o núcleo se apresenta em sua posição central). Entretanto, é evidente o predomínio de esteatose macrovesicular. Já no GO+IGF-1, observamos grande melhora do parênquima hepático, com redução quase total da esteatose macrovesicular, porém, permanecendo, ainda, alguns hepatócitos com esteatose microvesicular. A quantificação das gotículas de gordura evidenciou que GO ($1097 \pm 135,5$) apresentou aumento significativo das gotículas de gordura por área em relação com GC ($321,9 \pm 80,75$). De forma significativa, o tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir a esteatose hepática em 43,4% no GO+IGF-1 ($621,3 \pm 53,32$) quando comparado ao GO.

Gráfico 6: Estimativa da esteatose hepática



Onde os dados são expressos como média \pm EPM. "a" diferença significativa em relação ao GC, "b" diferença significativa em relação ao GO.

Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos dos fígados corados com hematoxilina e eosina



Aumento de 400X. (A) Grupo controle; (B) Grupo obeso; (C) Grupo obeso + IGF-1. As setas (→) indicam hepatócitos com esteatose microvesicular e os asteriscos (*) hepatócitos com esteatose macrovesicular.

Gráfico 7: Análise quantitativa da esteatose hepática

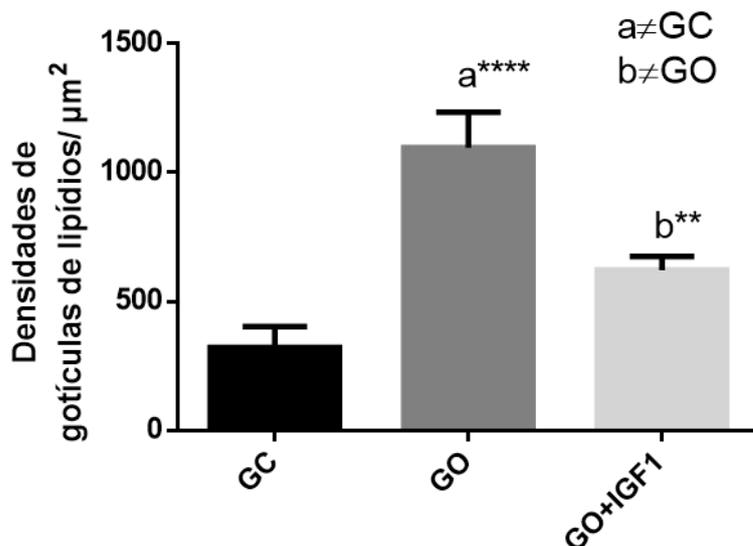
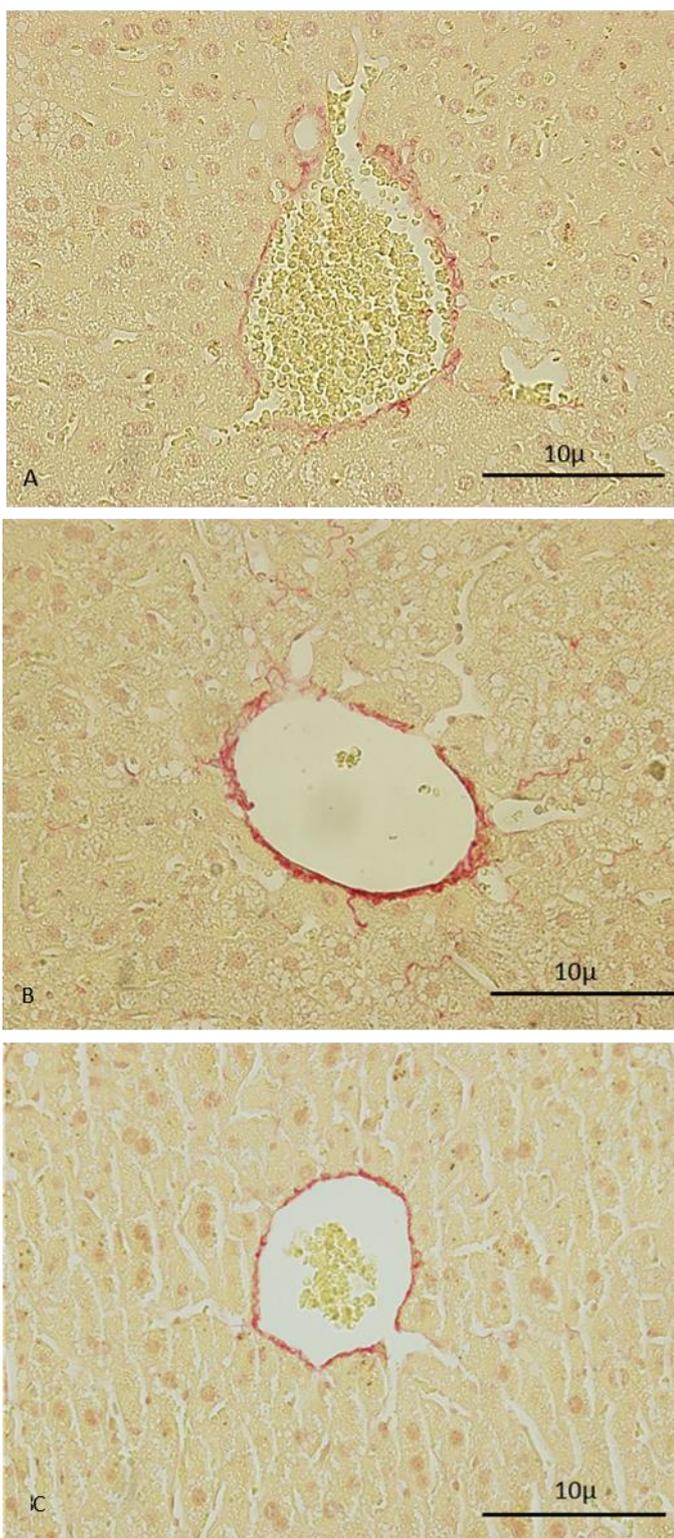


Gráfico da quantificação das gotículas de lipídeo no parênquima hepático. Onde os dados são expressos como média \pm EPM. “a” diferença significativa em relação ao GC, “b” diferença significativa em relação ao GO.

5.5 Análise da Fibrose hepática

Para a análise da fibrose, realizamos uma coloração com Picro-Sirius Red, que evidencia a deposição de colágeno no tecido alvo e possibilita a quantificação destas áreas (Figura 11). Observamos maior deposição de colágeno no parênquima hepático do GO, ao redor dos vasos e por entre os cordões de hepatócitos (perissinusoidal). Houve diminuição da deposição de colágeno no GO+IGF-1, que se restringiu ao redor dos vasos, semelhante ao GC. A análise quantitativa da área corada por Picro-Sirius Red demonstrou um aumento significativo de 30% da concentração de colágeno no GO em relação ao GC, caracterizando o remodelamento adverso da matriz extracelular. Em contrapartida, após o tratamento com IGF-1, ocorreu uma redução significativa de 43% da área de fibrose no GO+IGF-1 comparado ao GO (gráfico 8).

Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos dos fígados corados com Picro-Sirius Red, que mostram a distribuição de colágeno em vermelho. Aumento de 400X



(A) Grupo controle; (B) Grupo obeso; (C) Grupo obeso + IGF-1.

Gráfico 8: Análise quantitativa da fibrose hepática

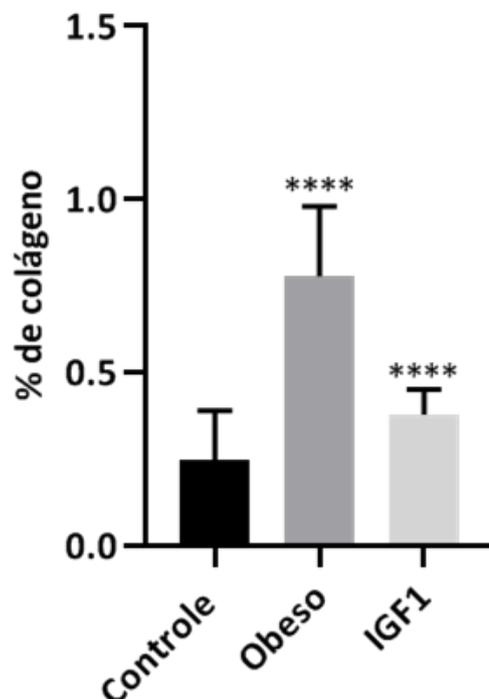
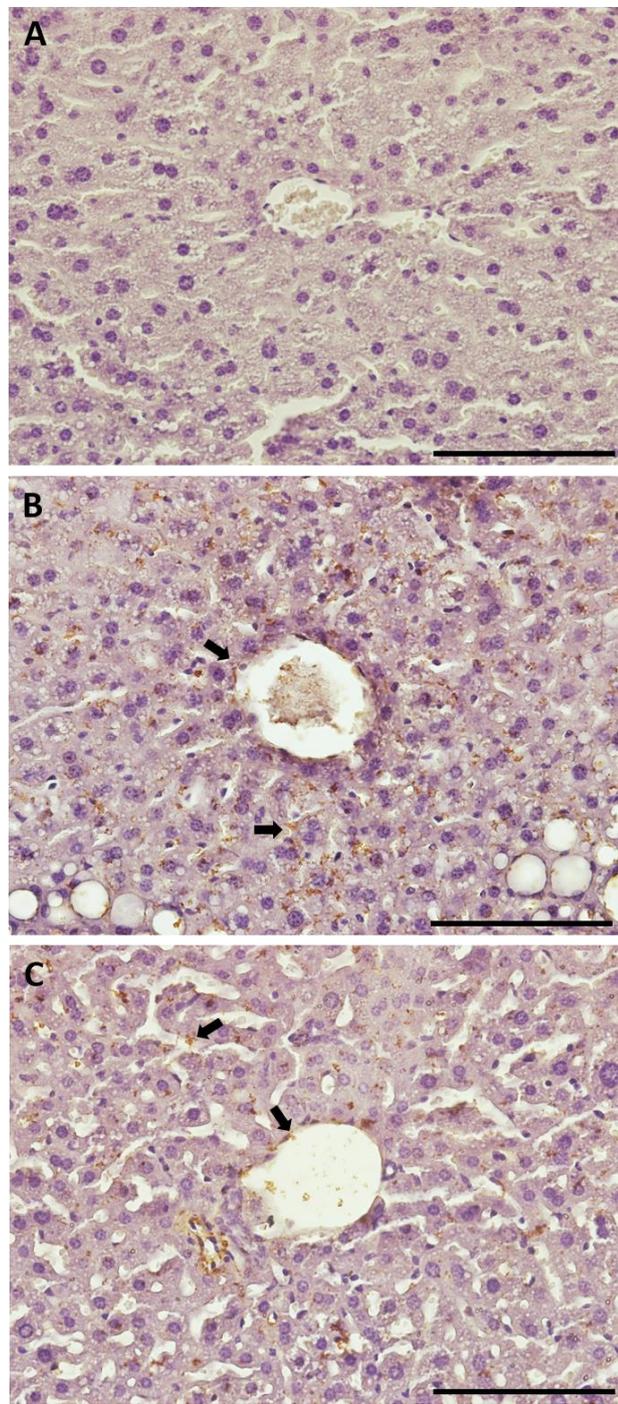


Gráfico da quantificação da área de deposição de colágeno. Os dados são expressos como média \pm EPM. "a" diferença significativa em relação ao GC, "b" diferença significativa em relação ao GO.

5.6. Análise da expressão de alfa-actina de músculo liso (α -SMA)

A expressão de α -SMA no fígado foi analisada com imuno-histoquímica (Figura 12). Observamos aumento da marcação positiva para α -SMA nos fígados do GO comparado ao GC. O tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir a expressão de α -SMA.

Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado imunomarcados com o anticorpo específico para alfa-actina de músculo liso, mostrando a sua marcação em castanho (setas) e núcleos contra-corados com hematoxilina, em roxo



(A) Grupo controle – sem evidência de marcação; (B) Grupo obeso – apresentou forte marcação entre os cordões de hepatócitos e ao redor da veia centro-lobular; (C) Grupo obeso + IGF-1 – apresentou diminuição da marcação distribuída por entre os cordões de hepatócitos e ao redor da veia centro-lobular comparado ao grupo obeso. Objetiva de 40x; Barra=10 μ m.

6 DISCUSSÃO

O perfil nutricional da população global vem sendo alterado nas últimas décadas com aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, compostos por elevado teor de carboidratos simples e gordura saturada (dieta ocidental). Conseqüentemente, observamos uma elevação do consumo calórico em detrimento do seu gasto, o que resulta em índices alarmantes de obesidade. Nesse estudo, reproduzimos esse padrão alimentar, empregando o modelo descrito por Tikellis et al. (2008) em camundongos *Swiss machos*, já bem estabelecido pelo nosso grupo há alguns anos (D. Andrade et al., 2020; Neves et al., 2014; Oliveira et al., 2014, 2021), a fim de avaliar o potencial terapêutico do IGF-1 na DHGNA induzida por dieta ocidental sobre a reestruturação do parênquima hepático (Tikellis et al., 2008).

No consumo alimentar (Kcal), observamos crescente evolução da ingestão calórica, com diferença significativa a partir da 5ª semana de dieta. Conseqüentemente, um aumento da massa corporal do GO também ocorreu a partir da quinta semana, comparado ao GC. Além disso, o GO apresentou aumento significativo em diversos parâmetros biométricos, como índice de Lee, glicemia em jejum, gordura epididimal e gordura retroperitoneal. O comprimento naso-anal não apresentou diferença entre os grupos. Sendo assim, nossos resultados estão compatíveis com o caráter obesogênico da dieta (Fuster, 2016; Kang et al., 2016).

A administração do IGF-1 foi capaz de promover uma diminuição significativa dos valores dos parâmetros biométricos no GO+IGF-1. O IGF-1 atua nas vias metabólicas anabólicas sendo capaz de agir na redução da gordura. De fato, alguns ensaios clínicos já avaliaram a eficácia da terapia com IGF-1 recombinante em pacientes obesos na redução de massa corporal (Berryman et al., 2013). O GO apresentou intolerância à glicose, distúrbio metabólico já observado pelo nosso grupo e compatível com o encontrado em camundongos obesos e pré-diabéticos (D. Andrade et al., 2020; Neves et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Pouvreau et al., 2018). É importante ressaltar que o tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir significativamente a glicemia de jejum.

A obesidade decorrente do aumento excessivo do consumo de calorias oriundo da dieta ocidental promove o depósito de gordura no fígado levando à esteatose hepática. Conseqüentemente, ocorre o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, resultando no estado de hipertrofia celular lipídica. A concentração excessiva de lipídeo intracelular no hepatócito acarreta a esteatose, conferindo ao parênquima hepático duas características histológicas distintas. Na primeira, microvesicular, o citoplasma do hepatócito é acometido por pequenos vacúolos lipídicos e o núcleo está localizado no centro da célula. Já a macrovesicular, é caracterizada por grandes vacúolos repleto de lipídeos por todo citoplasma com conseqüente restrição do núcleo na periferia da célula (Takahashi et al., 2012).

Um estudo mostrou que camundongos isogênicos alimentados com uma dieta rica em gordura e carboidratos por 8 a 12 semanas apresentaram aumento do peso do fígado e lesão hepática com formação de fibrose, característico de EHNA. Na análise do parênquima hepático em cortes histológicos corados com HE, observou-se regiões de balonização dos hepatócitos e corpos de Mallory-Denk devido à alta quantidade de gordura no fígado. Camundongos *knockout* para Galectina-3, uma proteína de ligação com papel regulador no imunometabolismo e na fibrogênese, que receberam dieta hipercalóricas, desenvolveram obesidade e apresentaram acúmulo de gordura no fígado, desenvolvendo lesão hepática com esteatose macrovesicular (Pejnovic et al., 2016).

Nossos resultados mostraram que a dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gordura saturada, gerou aumento da massa corporal, desencadeando a obesidade. Para a avaliação da esteatose em nosso modelo, realizamos, a princípio a estimativa de esteatose hepática, mensurada pela correção do peso do fígado (g) pela massa corporal (g) do camundongo, mostrando um aumento significativo da razão no GO quando relacionado com o GC, indicando o aumento do fígado ocasionado pelo acúmulo de gordura. Entretanto, o GO+IGF-1 demonstrou diminuição da massa do fígado. Para corroborar esses resultados iniciais, indicativos de esteatose, o parênquima hepático foi analisado por microscopia de luz. Observamos grande quantidade de gotículas lipídicas no parênquima hepático do GO, característico da EH, tanto microvesicular quanto macrovesicular. Contudo, os animais tratados por apenas uma semana com IGF-1 apresentaram uma diminuição considerável da densidade das gotículas lipídicas,

que ficaram reduzidas a algumas regiões de EH microvesicular, gerando uma melhora do parênquima hepático dos camundongos. Hitoshi Nishizawa e colaboradores (2012), em um modelo de rato com deficiências de GH (SDR), relevou que estes ratos apresentaram EH, fibrose hepática e aumento do estresse oxidativo de acordo com o fenótipo do DHGNA. O modelo apresentou uma redução significativa de marcadores de função hepática, o aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e triglicérideo hepático, comparado ao grupo controle. E tanto a administração de GH quanto a administração de IGF-1 exibiram melhora significativa nessas condições fenotípicas da DHGNA, sugerindo que ambas as ações independentes do GH e do IGF-1 desempenham um papel essencial no fígado (Nishizawa et al., 2012).

O excesso de lipídeos intra-hepáticos promove um ambiente lipotóxico que pode ser caracterizado pelo estresse oxidativo, peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e extensa morte hepatocelular (Del Campo et al., 2018). As células de Kupffer absorvem grandes quantidades de ácidos graxos, o que as leva a um fenótipo inflamatório. Isso leva à secreção de citocinas inflamatórias, como IL -6, TNF- α e IL-1 β . Além das células de Kupffer, outras células imunes são recrutadas para o tecido, contribuindo para o perfil inflamatório (Heyens et al., 2021). Neste contexto, as células sinusoidais e as CEH, assim como células imunes residentes e recrutadas, secretam fatores pró-fibróticos, como o TGF- β e ERO (Tilg & Moschen, 2010). Tais eventos estimulam a fibrogênese, pois ativam as CEH, responsáveis pela deposição de MEC, alterando o parênquima hepático e a funcionalidade do fígado (Buzzetti et al., 2016; Weiskirchen et al., 2018).

Na lesão hepática conferida pela lipotoxicidade, as CEH são ativadas por infiltração de células imunes e lesão de hepatócitos devido à inflamação e se diferenciam do fenótipo quiescente em miofibroblastos proliferativos e contráteis (Affo et al., 2017). Os miofibroblastos (CEH ativadas) expressam α -actina de músculo liso (α -SMA) e são responsáveis pela produção de componentes de MEC, como colágeno I, III e IV (Heyens et al., 2021; Ramzy et al., 2018). O acúmulo de colágeno é acompanhado do desbalanço entre as concentrações de MMPs e TIMPs. Em fígados fibróticos de murinos, o aumento de MMPs foi acompanhado de altas concentrações de TIMP-1. Isso cria um distúrbio no equilíbrio MMP / TIMP com uma

mudança em direção à síntese de MEC e, portanto, à fibrogênese (Roeb et al., 1997; Yoshiji et al., 2000).

Histologicamente, a fibrose promove alteração intralobular. A deposição de matriz se origina nas regiões perissinusoidais (fibrose perissinusoidal) e periportais. Um trabalho utilizou o modelo de dieta *high fat* com camundongos C57BL / 6 com três dietas diferentes, uma rica em gordura, uma dieta rica em açúcar (com uso de leite condensado contendo 68% de energias em forma de carboidratos) e uma combinação de dieta rica em gordura e açúcar. O modelo apresentou características obesogênicas com desenvolvimento de EHNA. A análise histológica mostrou que os animais alimentados com dietas obesogênicas, comparadas à padrão, apresentaram alta deposição de colágeno do tipo I no fígado (Asgharpour et al., 2016).

Nossos achados mostraram que o GO apresentou maior deposição de colágeno nas áreas próximas a tríade portal, ao redor da veia centro-lobular e nos espaços perissinusoidais, o que coincidiu com a área de marcação de α -SMA, marcador de CEH ativada (miofibroblasto). Esses dados indicam que a dieta ocidental desencadeou um processo de lipotoxicidade e inflamação responsáveis pela ativação do perfil fibrogênico da CEH. O GO+IGF-1, após um tratamento de curto prazo, apresentou redução significativa da área de fibrose hepática, indicando ação hepatoprotetora do IGF-1. Um estudo em modelo de EHNA utilizando camundongos db / db alimentados com dieta deficiente em metionina-colina e tratados com IGF-1 observou redução dos marcadores pró-fibróticos, como *procolágeno 1a1* e *colágeno 4a1* e de marcadores inflamatórios, como *Il-1 β* e *Il-6* por PCR. Além da redução do número de células positivas para α -SMA, indicando um efeito direto do IGF-1 sobre a CEH ativada, pois o IGF-1R foi encontrado na superfície desta célula. O IGF-1 promoveria a sua senescência, que foi avaliada pela atividade da β -galactosidase tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O IGF-1 também promoveu o aumento de *Mmp9* e a redução de *Timp1*, favorecendo a resolução da fibrose (Nishizawa et al., 2016). Em outro estudo, utilizando modelos murinhos transgênicos (SMP8-IGF-I) induzidos a um estado cirrótico com tetracloreto de carbono - CCl₄, observou-se que os camundongos SMP8-IGF-I exibiram diminuição da expressão de α -SMA e melhora morfológica do parênquima hepático, restringindo a ativação das CEH e diminuindo a fibrogênese (Sanz et al., 2005).

Esses dados confirmam os nossos resultados, nos quais o tratamento com IGF-1 está relacionado à menor expressão de α -SMA nos cordões de hepatócitos, promovendo uma melhora do fígado.

CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta ocidental causa EHNA, evidenciada pela presença de esteatose e fibrose hepática em modelo animal. O tratamento de curta duração com IGF-1 foi eficaz para a recuperação do parênquima hepático, contribuindo para a melhora da DHGNA, representando uma abordagem terapêutica promissora.

REFERÊNCIAS

- ABESO. (2016). Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO. 4.Ed. - São Paulo, SP., 1–188. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732000000100003>
- Abu Rmilah, A., Zhou, W., Nelson, E., Lin, L., Amiot, B., & Nyberg, S. L. (2019). Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 8(3), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wdev.340>
- Adamek, A., & Kasprzak, A. (2018). Insulin-like growth factor (IGF) system in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms19051308>
- Affo, S., Yu, L. X., & Schwabe, R. F. (2017). The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 12(November 2016), 153–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100322>
- Álvarez-Nava, F., & Lanes, R. (2017). GH/IGF-1 signaling and current knowledge of epigenetics; A review and considerations on possible therapeutic options. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18101624>
- Andrade, D. C., De Carvalho, S. N., Pinheiro, D., Thole, A. A., Moura, A. S., De Carvalho, L., & Cortez, E. A. C. (2015). Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats. *Experimental Cell Research*, 336(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.05.002>
- Andrade, D., Oliveira, G., Menezes, L., Nascimento, A. L., Carvalho, S., Stumbo, A. C., Thole, A., Garcia-Souza, É., Moura, A., Carvalho, L., & Cortez, E. (2020). Insulin-like growth factor-1 short-period therapy improves cardiomyopathy stimulating cardiac progenitor cells survival in obese mice. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(1), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.09.001>
- Anisimov, V. N., & Bartke, A. (2013). The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 87(3), 201–223. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.005>

- Asgharpour, A., Cazanave, S. C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B. A., Kumar, D. P., Daita, K., Min, H. K., Mirshahi, F., Bedossa, P., Sun, X., Hoshida, Y., Koduru, S. V., Contaifer, D., Warncke, U. O., Wijesinghe, D. S., & Sanyal, A. J. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology*, *65*(3), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>
- Barbosa, Jarbas; Menezes, A.; Emanuelli, P. (2018). USE OF CELL THERAPY WITH STEM CELLS IN MEDICAL SPECIALTIES IN BRAZIL: SYSTEMATIC REVIEW. *Revista UNINGÁ*, *55*, 85–100.
- Barry M. Popkin. (2011). The double burden of malnutrition. Case studies from six developing countries. *FAO Food and Nutrition Paper*, *84*(July 2010), 1–334. <https://doi.org/10.1017/S0029665110003903>.Contemporary
- Bentham, J., Di Cesare, M., Bilano, V., Bixby, H., Zhou, B., Stevens, G. A., Riley, L. M., Taddei, C., Hajifathalian, K., Lu, Y., Savin, S., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Chirita-Emandi, A., Hayes, A. J., Katz, J., Kelishadi, R., Kengne, A. P., Khang, Y. H., ... Cisneros, J. Z. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, *390*(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)
- Berryman, D. E., Glad, C. A. M., List, E. O., & Johannsson, G. (2013). The GH/IGF-1 axis in obesity: Pathophysiology and therapeutic considerations. *Nature Reviews Endocrinology*, *9*(6), 346–356. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.64>
- Bonfeld, K., & Møller, S. (2011). Insulin-like growth factor-I and the liver. *Liver International*, *31*(7), 911–919. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02428.x>
- Brasil. (2019). Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico. In *G. Estatística e Informação em Saúde*. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011_fatores_risco_doenças_cronicas.pdf
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, *65*(8), 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>

- Cabrera, D., Cabello-Verrugio, C., Solís, N., Martín, D. S., Cofré, C., Pizarro, M., Arab, J. P., Abrigo, J., Campos, F., Irigoyen, B., Carrasco-Avino, G., Bezares, K., Riquelme, V., Riquelme, A., Arrese, M., & Barrera, F. (2018). Somatotropic axis dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial hepatic and systemic effects of hormone supplementation. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19051339>
- Caligiuri, A., Gentilini, A., & Marra, F. (2016). Molecular pathogenesis of NASH. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091575>
- Carvalho, S., Cortez, E., Stumbo, A. C., Thole, A., Caetano, C., Marques, R., Pelajo-Machado, M., Porto, L. C., & Carvalho, L. (2008). Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats. *Cell Biology International*, *32*(8), 1014–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.04.003>
- Carvalho, S. N., Lira, D. C., Oliveira, G. P., Thole, A. A., Stumbo, A. C., Caetano, C. E., Marques, R. G., & Carvalho, L. (2010). Decreased collagen types i and IV, laminin, CK-19 and α -SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. *Histochemistry and Cell Biology*, *134*(5), 493–502. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0746-2>
- Carvalho, Simone Nunes, Helal-Neto, E., De Andrade, D. C., Costa Cortez, E. A., Thole, A. A., Barja-Fidalgo, C., & De Carvalho, L. (2013). Bone marrow mononuclear cell transplantation increases metalloproteinase-9 and 13 and decreases tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and 2 expression in the liver of cholestatic rats. *Cells Tissues Organs*, *198*(2), 139–148. <https://doi.org/10.1159/000353215>
- Caviglia, G. P., Rosso, C., Fagoonee, S., Saracco, G. M., & Pellicano, R. (2017). Liver fibrosis: The 2017 state of art. *Panminerva Medica*, *59*(4), 320–331. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.17.03359-6>
- Cazanave, S. C., Elmi, N. A., Akazawa, Y., Bronk, S. F., Mott, J. L., & Gores, G. J. (2010). CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoptosis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *299*(1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2010>
- Chizuko Yamamuro, Jian-Kang Zhu, Z. Y. (2016). The Somatotropic Axis and Aging:

- Benefits of Endocrine Defects. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.002>
- Cury, G. F., Ribeiro, J. V. O. L., Custódio, J. R. A., & Mendes, L. S. C. (2021).
 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. *As Principais Doenças Do Aparelho Digestivo - Um Guia Prático Para Pacientes*, 83–87.
<https://doi.org/10.29327/533410.1-15>
- Del Campo, J. A., Gallego, P., & Grande, L. (2018). Role of inflammatory response in liver diseases: Therapeutic strategies. *World Journal of Hepatology*, 10(1), 1–7.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i1.1>
- Dias, P. C., Henriques, P., Dos Anjos, L. A., Burlandy, L., & Para, G. (2017).
 Obesidade - Estratégias. In *Cadernos de Saude Publica* (Vol. 33, Issue 7).
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., Laura, E., & Clinic, C. (2016).
 Kupffer Cells in the Liver. *Compr Physiology*, 3(2), 785–797.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Dobbs, R.; Sawers, C.; Thmpson, F.; Manyika, J.; Woetzel, J.; Child, P. (2014).
Overcoming obesity : An initial economic analysis Executive summary Discussion paper (Issue November).
- Fallis, A. . (2013). Atlas Visual Corpo Humano. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Fuster. (2016). Welcome address at the Aberdeen Art Gallery. *World Patent Information*, 19(11), 11. [https://doi.org/10.1016/s0172-2190\(97\)82761-5](https://doi.org/10.1016/s0172-2190(97)82761-5)
- Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H., & Heymsfield, S. B. (2018). Fisiopatologia e Manejo da Obesidade. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(1), 1–16.
- Garcia, V. D. (2020). Número de transplante de órgãos sólidos e tecidos de janeiro a setembro de 2020. *Registro Brasileiro de Transplantes*, 3, 3.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). Color Atlas and Text of Histology-sixth editon. In *Lippinot Williams and Wilkins*.
- Grigoraș, A., Giușcă, S. E., Avădănei, E. R., Amălinei, C., & Căruntu, I. D. (2016).
 Pointing at ito cell, from structure to function (... or cinderella story in liver histology). *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 57(3), 915–923.
- Heyens, L. J. M., Busschots, D., Koek, G. H., Robaey, G., & Francque, S. (2021).
 Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-

- invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Medicine*, 8(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.615978>
- Junqueira, L C.; Carneiro, J. (2013). *Sumário Índice Remissivo* (G. Koogan (ed.); 12th ed.). ABDR.
- Kang, Y. E., Kim, J. M., Joung, K. H., Lee, J. H., You, B. R., Choi, M. J., Ryu, M. J., Ko, Y. B., Lee, M. A., Lee, J., Ku, B. J., Shong, M., Lee, K. H., & Kim, H. J. (2016). The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PLoS ONE*, 11(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154003>
- Karanjia, R. N., Crossey, M. M. E., Cox, I. J., Fye, H. K. S., Njie, R., Goldin, R. D., & Taylor-Robinson, S. D. (2016). Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World Journal of Gastroenterology*, 22(45), 9880–9897. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i45.9880>
- Kasprzak, A., Kwasniewski, W., Adamek, A., & Gozdzicka-Jozefiak, A. (2017). Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 772, 78–104. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.007>
- Kierszenbaum. (2008). *Histologia e Biologia celular: Uma Introdução à Patologia* (2ª edição). ABDR.
- Lindsey, C.; Rundle, C.; Mohan, S. (2018). Role of IGF-I and Efn–Eph Signaling in Skeletal Metabolism. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0284>.Role
- Martinelli Jr, C. E., Custódio, R. J., & Aguiar-Oliveira, M. H. (2008). Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(5), 717–725. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000500002>
- Mazzoccoli, G., De Cosmo, S., & Mazza, T. (2018). The biological clock: A pivotal hub in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Frontiers in Physiology*, 9(MAR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00193>
- Monteiro, E. G. (2016). *Vias de Sinalização Envolvidas na Regulação Hormonal do Metabolismo de Células de Sertoli Humanas e de Ratos: Papel da Insulina, do IGF-1 e do FSH*.
- Neves, F. A., Cortez, E., Bernardo, A. F., Mattos, A. B. M., Vieira, A. K., de O.

- Malafaia, T., Thole, A. A., Alessandra, A. C., Garcia-Souza, É. P., Sichieri, R., & Moura, A. S. (2014). Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(1), 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.014>
- Nishizawa, H., Iguchi, G., Fukuoka, H., Takahashi, M., Suda, K., Bando, H., Matsumoto, R., Yoshida, K., Odake, Y., Ogawa, W., & Takahashi, Y. (2016a). IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Scientific Reports*, *6*(October), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep34605>
- Nishizawa, H., Iguchi, G., Fukuoka, H., Takahashi, M., Suda, K., Bando, H., Matsumoto, R., Yoshida, K., Odake, Y., Ogawa, W., & Takahashi, Y. (2016b). IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Scientific Reports*, *6*(October), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep34605>
- Nishizawa, H., Takahashi, M., Fukuoka, H., Iguchi, G., Kitazawa, R., & Takahashi, Y. (2012). GH-independent IGF-I action is essential to prevent the development of nonalcoholic steatohepatitis in a GH-deficient rat model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *423*(2), 295–300.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.115>
- OECD. (2019). *The Heavy Burden of Obesity* (OECD Health). OECD Health Policy Studies The. <https://doi.org/10.1787/b53ed5f9-fr>
- Oliveira, G. P., Cortez, E., Araujo, G. J., De Carvalho Sabino, K. C., Neves, F. A., Bernardo, A. F., De Carvalho, S. N., Moura, A. S., Carvalho, L., & Thole, A. A. (2014). Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. *Cell and Tissue Research*, *357*(1), 185–194.
<https://doi.org/10.1007/s00441-014-1857-1>
- Oliveira, G. P., de Andrade, D. C., Nascimento, A. L. R., Cortez, E., de Carvalho, S. N., Stumbo, A. C., Garcia-Souza, É., Moura, A. S., Carvalho, L., & Thole, A. A. (2021). Insulin-like growth factor-1 short-period therapy stimulates bone marrow cells in obese swiss mice. *Cell and Tissue Research*, *384*(3), 721–734.
<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03357-9>
- Osborn, O., & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine*, *18*(3), 363–374.

- <https://doi.org/10.1038/nm.2627>
- Oseini, A. M., & Sanyal, A. J. (2017). Therapies in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Liver International*, 37(Suppl 1), 97–103.
<https://doi.org/10.1111/liv.13302>
- Paes Da Silva, M., Jorge, Z., Domingues, A., Lacerda Nobre, E., Chambel, P., & Jácome De Castro, J. (2006). Obesidade e qualidade de vida. *Acta Medica Portuguesa*, 19(3), 247–250.
- Pejnovic, N., Jeftic, I., Jovicic, N., Arsenijevic, N., & Lukic, M. L. (2016). Galectin-3 and IL-33/ST2 axis roles and interplay in dietinduced steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9706–9717.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9706>
- Pinheiro, D., Dias, I., Freire, T., Thole, A. A., Stumbo, A. C., Cortez, E. A. C., de Carvalho, L., & de Carvalho, S. N. (2021). Effects of mesenchymal stem cells conditioned medium treatment in mice with cholestatic liver fibrosis. *Life Sciences*, 281(June), 119768. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119768>
- Pinheiro, D., Dias, I., Silva, K. R., Stumbo, A. C., Thole, A., Cortez, E., Carvalho, L. De, & Weiskirchen, R. (2019). Mechanisms Underlying Cell Therapy in Liver. *Cells*, 1–30.
- Pinheiro, D., Leirós, L., Dáu, J. B. T., Stumbo, A. C., Thole, A. A., Cortez, E. A. C., Mandarim-De-Lacerda, C. A., De Carvalho, L., & De Carvalho, S. N. (2017). Cytokines, hepatic cell profiling and cell interactions during bone marrow cell therapy for liver fibrosis in cholestatic mice. *PLoS ONE*, 12(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187970>
- Pinto, A. M., & Rosa, M. S. (2001). Mecanismos De Resposta Do Hospedeiro À Agressã. *Resposta Inflamatória*, 185–218.
- Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>
- Porto, T. N. R. dos S., Cardoso, C. L. da R., Balduino, L. S., Martins, V. de S., Alcântara, S. M. L., & Carvalho, D. P. (2019). Prevalência do excesso de peso e fatores de risco para obesidade em adultos. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 22, e308. <https://doi.org/10.25248/reas.e308.2019>
- Pouvreau, C., Dayre, A., Butkowski, E. G., De Jong, B., & Jelinek, H. F. (2018).

- Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *Journal of Inflammation Research*, 11, 61–68. <https://doi.org/10.2147/JIR.S148911>
- Ramzy, M. M., Abdelghany, H. M., Zenhom, N. M., & El-Tahawy, N. F. (2018). Effect of histone deacetylase inhibitor on epithelial-mesenchymal transition of liver fibrosis. *IUBMB Life*, 70(6), 511–518. <https://doi.org/10.1002/iub.1742>
- Res, M., Ruts, C., Hospital, C. R., Sciences, M., Committee, I. E., & Crh-smims, S. (2020). *Prevalence of obesity: Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity*. May, 517–520. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>
- Richard, D., Corrine, S., Fraser, T., James, M., Jonathan, W., Peter, C., Sorcha, M., & Angela, S. (2014). Overcoming obesity : An initial economic analysis Discussion paper. *McKinsey Global Institute*, November, 1–71.
- Roeb, E., Purucker, E., Breuer, B., Nguyen, H., Heinrich, P. C., Rose-John, S., & Matern, S. (1997). TIMP expression in toxic and cholestatic liver injury in rat. *Journal of Hepatology*, 27(3), 535–544. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(97\)80359-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(97)80359-5)
- Roskams, T. (2008). Relationships Among Stellate Cell Activation, Progenitor Cells, and Hepatic Regeneration. *Clinics in Liver Disease*, 12(4), 853–860. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2008.07.014>
- Ross, M. (2016). *Histologia Texto e Atlas* (7th ed.). Gen.
- Sanz, S., Pucilowska, J. B., Liu, S., Rodríguez-Ortigosa, C. M., Lund, P. K., Brenner, D. A., Fuller, C. R., Simmons, J. G., Pardo, A., Martínez-Chantar, M. L., Fagin, J. A., & Prieto, J. (2005). Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut*, 54(1), 134–141. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.024505>
- Saúde, M. da. (2020). *Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil*.
- Schwabe. (2020). Mechanisms of Fibrosis Development in NASH Robert. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.311>.Mechanisms
- Senoo, H., Mezaki, Y., & Fujiwara, M. (2017). The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anatomical Science International*, 92(4), 387–455. <https://doi.org/10.1007/s12565-017-0395-9>
- Shojaie, L., Iorga, A., & Dara, L. (2020). Cell death in liver diseases: A review.

- International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–47.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249682>
- Singh, S., Osna, N. A., & Kharbanda, K. K. (2017). Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World Journal of Gastroenterology*, 23(36), 6549–6570. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>
- Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016). Obesity Statistics. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 43(1), 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2015.10.001>
- Sousa, R., & Pinho, D. E. O. (2009). *Universidade Federal Do Maranhão Centro De Ciências Biológicas E Da Saúde*. 0–30.
- Takahashi, Y., Soejima, Y., & Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2300–2308. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2300>
- Thurairajah, K., Broadhead, M. L., & Balogh, Z. J. (2017). Trauma and stem cells: Biology and potential therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030577>
- Tikellis, C., Thomas, M. C., Harcourt, B. E., Coughlan, M. T., Pete, J., Bialkowski, K., Tan, A., Bierhaus, A., Cooper, M. E., & Forbes, J. M. (2008). Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(2), 323–330. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00024.2008>
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836–1846. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2018). *The liver*. 27(21). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.The
- Wannmacher, L. (2016). Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. *OPAS/OMS – Representação Brasil*, 1(7), 1–10.
- Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., & Tacke, F. (2018). Recent advances in understanding liver fibrosis: Bridging basic science and individualized treatment concepts [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, 7(0), 1–17. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14841.1>
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U. P., Gomez, D. E., Kawata,

M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Thorgeirsson, S. S., & Fukui, H. (2000). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology*, 32(6), 1248–1254. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.20521>