

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E
HEPATOLOGIA

Influência da Disbiose Intestinal no Risco Cardiovascular em Modelo Experimental
Híbrido de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica em Ratos

LARISSE LONGO

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2018

Larisse Longo

Influência da Disbiose Intestinal no Risco Cardiovascular em Modelo Experimental
Híbrido de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica em Ratos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Carolina Uribe-Cruz

PORTO ALEGRE, BRASIL

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Longo, Larisse

Influência da Disbiose Intestinal no Risco Cardiovascular em Modelo Experimental Híbrido de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica em Ratos / Larisse Longo. -- 2018.

129 f.

Orientador: Mário Reis Álvares-da-Silva.

Coorientador: Carolina Uribe-Cruz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Doença hepática gordurosa não-alcoólica. 2. Risco cardiovascular. 3. Microbiota intestinal. 4. Modelo experimental. I. Álvares-da-Silva, Mário Reis, orient. II. Uribe-Cruz, Carolina, coorient.

III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livre e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.”

A. J. Cronin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo carinho, incentivo e por sempre ficarem ao meu lado. Ao Fernando Salvati, agradeço o amor, a amizade e o companheirismo. Obrigada, vocês são fundamentais na conquista dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Mário Reis Álvares-da-Silva, meu orientador e amigo, obrigada pelo incentivo, empenho e por acreditar em minha capacidade. Sinto um grande orgulho em participar da sua equipe. Agradeço profundamente por tudo.

À Profa. Dra. Carolina Uribe-Cruz, obrigada pela amizade, dedicação e colaboração durante a minha trajetória. Seus ensinamentos auxiliaram em minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira, pelos ensinamentos, confiança, amizade, dedicação e incentivo em mim depositados. Serei eternamente grata a este apoio.

Agradeço aos colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia por todos estes anos de convivência e companheirismo. Em especial, agradeço a Jéssica Tonin Ferrari, Gustavo Hirata Dellavia, Silvia Regina Bona, Amanda Pasqualotto, Rutiane Ullmann Thoen e Valessa Emanoele Gabriel de Souza pela colaboração essencial nos experimentos, cada um teve uma participação especial na realização deste projeto.

Ao Núcleo de Pesquisa em Vacinas (NUCLIVAC) do Centro de Pesquisa Clínica por torcerem por mim, estarem ao meu lado e proporcionarem diversos momentos de alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo constante aprendizado e auxílio dispensados nesta jornada.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por acreditar na pesquisa e proporcionar o desenvolvimento deste estudo. Aos profissionais do Centro de Pesquisa Experimental, em especial, à secretaria, em nome de Everaldo Almeida, a toda equipe da Unidade de Experimentação Animal, à Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, ao Laboratório de Patologia Experimental e ao Centro de Terapia Gênica, meu carinho e reconhecimento.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo aporte financeiro para que esse estudo fosse concluído.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica.....	13
2.2 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica e Risco Cardiovascular	17
2.3 microRNAs: DHGNA e Risco Cardiovascular	24
2.4 Microbiota Intestinal e o Eixo Fígado-Intestino	29
2.4.1 Composição da Microbiota Intestinal.....	36
2.5 Modelos Experimentais.....	39
3. JUSTIFICATIVA	46
4. QUESTÕES DE PESQUISA	47
5. HIPÓTESES.....	48
6. OBJETIVOS	49
6.1 Objetivo Geral.....	49
6.2 Objetivos Específicos.....	49
7. ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS	51
7.1 Artigo I	51
7.2 Artigo II	77
8. CONCLUSÕES	105
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	108
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

RESUMO

Introdução: A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma doença hepática progressiva que é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV). Transtornos do eixo fígado-intestino, incluindo a disbiose intestinal, têm sido associados à DHGNA e DCV.

Objetivos: Desenvolver um modelo experimental de DHGNA de origem metabólica que permita avaliar, na sequência, fatores relacionados à DCV, como índices aterogênicos, inflamação hepática e sistêmica e disfunção endotelial, bem como a associação entre a composição e a diversidade da microbiota intestinal e sua relação com o risco de desenvolvimento de DVC.

Métodos: Ratos *Sprague Dawley*, adultos e machos, foram randomizados em dois grupos (n=10): controle, alimentado com dieta padrão, e intervenção, que recebeu dieta hiperlipídica deficiente em colina. O experimento teve duração de 16 semanas e após os animais foram eutanasiados. Os materiais biológicos foram coletados e armazenados até a realização das avaliações bioquímicas, inflamatórias, histológicas e da microbiota fecal.

Resultados: Os animais do grupo intervenção apresentaram significativo aumento no delta de índice de Lee ($p = 0,017$), circunferência abdominal ($p < 0,001$), acúmulo de tecido adiposo abdominal ($p < 0,001$), bem como elevação dos níveis séricos de alanina aminotransferase ($p = 0,010$), glicemia ($p = 0,013$), colesterol total ($p = 0,033$), lipoproteína de baixa densidade ($p = 0,011$) e triglicerídeos ($p = 0,011$) e diminuição dos níveis séricos de lipoproteína de alta densidade ($p = 0,006$), similares às observadas na DHGNA em humanos. Todos os animais do grupo intervenção desenvolveram DHGNA, com ou sem a presença de esteato-hepatite, enquanto no grupo controle não houve qualquer

alteração histológica. Houve aumento significativo no grupo intervenção dos índices aterogênicos, coeficiente aterogênico ($p < 0,001$), índice de risco Castelli-I ($p < 0,001$) e índice de risco Castelli-II ($p < 0,001$), além de aumento significativo na concentração dos marcadores de inflamação e disfunção endotelial sistêmica, interleucina (IL)-1 β ($p < 0,001$), proteína quimiotática de monócitos-1 ($p < 0,001$), inibidor tecidual de metaloproteinases-1 ($p < 0,001$) e inibidor do ativador de plasminogênio-1 ($p < 0,019$). Houve um aumento na expressão gênica hepática do receptor *toll like* (TLR)-4 ($p = 0,041$), TLR-9 ($p = 0,033$), fator de diferenciação mielóide-88 ($p = 0,001$), receptor do tipo NOD-proteína-3 ($p = 0,019$), capase-1 ($p < 0,001$), fator de necrose tumoral- α ($p = 0,028$), IL-6 ($p = 0,013$) e IL-18 ($p = 0,007$), além da diminuição das expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- α ($p = 0,008$) em relação ao grupo controle. Observamos aumento significativo de miR-122 ($p = 0,041$) e miR-33a ($p = 0,001$) no grupo intervenção, e o inverso foi observado para miR-145 ($p = 0,010$) e miR-126 ($p < 0,001$). O grupo intervenção, apresentou diminuição significativa da diversidade bacteriana fecal e menor abundância relativa do filo *Firmicutes* ($p = 0,040$), o que se correlacionou com a gravidade histológica da DHGNA. **Conclusão:** O grupo intervenção apresentou alterações bioquímicas, inflamatórias e histopatológicas similares às aquelas observadas na DHGNA em humanos. Houve neste grupo, um aumento da obesidade visceral, dislipidemia, hiperglicemia, inflamação hepática e sistêmica, disfunção endotelial e um maior risco de desenvolvimento de DCV. Este modelo experimental, poderia ser utilizado no entendimento da fisiopatologia da DHGNA e sua evolução, bem como para estudos terapêuticos pré-clínicos que visem à cardioproteção na DHGNA, um desfecho habitualmente não avaliado em ensaios clínicos em humanos.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não-alcoólica; Dieta hiperlipídica deficiente em colina; Microbiota intestinal; Risco cardiovascular.

ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a progressive liver disease that is considered a risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD). Liver-gut axis disorders, including intestinal dysbiosis, have been associated with NAFLD and CVD. **Objective:** To develop an experimental model of NAFLD of metabolic origin that would allow to evaluate, in the sequence, factors related to CVD, such as atherogenic indices, hepatic and systemic inflammation and endothelial dysfunction, as well as the association between the composition and diversity of the gut microbiota and its relationship with the risk of developing CVD. **Methods:** Adult male Sprague Dawley rats were randomized into two groups (n = 10): control group that was fed standard diet and intervention group that received a high-fat and choline-deficient (HFCD) diet. The experiment had duration of 16 weeks and after the animals were euthanized. Biological materials were collected and stored until the biochemical, inflammatory, histological and fecal microbiota evaluations were performed. **Results:** The animals in the intervention group, showed a significantly greater delta Lee index ($p = 0.017$), abdominal circumference ($p < 0.001$), abdominal adipose tissue accumulation ($p < 0.001$), as well as elevation of serum levels of alanine aminotransferase ($p = 0.010$), glycemic ($p = 0.013$), total cholesterol ($p = 0.033$), low-density lipoprotein ($p = 0.011$), triglycerides ($p = 0.011$) and decreased serum levels of high-density lipoprotein ($p = 0.006$), corresponding to those observed in NAFLD in humans. All animals in the intervention group developed NAFLD, with or without the presence of steatohepatitis, while no histological changes were found in the control group. There was a significant increase in the intervention group, of atherogenic indices, atherogenic coefficient ($p < 0.001$), Castelli-I risk index ($p < 0.001$) and

Castelli-II risk index ($p < 0.001$), increased markers of systemic inflammation and endothelial dysfunction, interleukin (IL)-1 β ($p < 0.001$), monocyte chemoattractant protein-1 ($p < 0.001$), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 ($p < 0.001$) and inhibitor of plasminogen activator-1 ($p < 0.019$). There was an increase in hepatic gene expression of toll-like receptor (TLR)-4 ($p = 0.041$), TLR-9 ($p = 0.033$), myeloid differentiation primary response-88 ($p = 0.001$), nod-like receptor protein-3 ($p = 0.019$) caspase-1 ($p < 0.001$), tumor necrosis factor- α ($p = 0.028$), IL-6 ($p = 0.013$) and IL-18 ($p = 0.007$), besides the diminution of the expression of peroxisome proliferator activated receptor- α ($p = 0.008$) in relation to the control group. We observed a significant increase of miR-122 ($p = 0.041$) and miR-33a ($p = 0.001$) in the intervention group, and the inverse was observed for miR-145 ($p = 0.010$) and miR-126 ($p < 0.001$). The intervention group showed a significant decrease in the fecal bacterial diversity and lower relative abundance of the *Firmicutes* phylum ($p = 0.040$), which correlated with the histological severity of NAFLD. **Conclusion:** The intervention group presented biochemical, inflammatory and histopathological alterations, similar to those observed in NAFLD in humans. There were in this group, an increase in visceral obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, systemic and hepatic inflammation, endothelial dysfunction and an increased risk of developing CVD. This experimental model could be used to understand the pathophysiology of NAFLD and its evolution, as well as for preclinical therapeutic studies that aim at cardioprotection in NAFLD, an outcome not usually evaluated in clinical trials in humans.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease; Choline-deficient, high-fat diet; Gut microbiota; Cardiovascular risk.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*

ALT: alanina aminotransferase

ASC: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*

ASCVD: *atherosclerotic cardiovascular disease*

AST: aspartato aminotransferase

Casp-1: caspase-1

CHC: carcinoma hepatocelular

CpG: *cytidine-phosphate-guanosine*

DAC: doença arterial coronariana

DAMPs: *damage-associated molecular pattern molecules*

DCV: doença cardiovascular

DDC: dieta deficiente em colina

DDMC: dieta deficiente em metionina e colina

DHDC: dieta hiperlipídica deficiente em colina

DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica

DM-2: diabetes melito tipo-2

EHNA: esteato-hepatite não alcoólica

ELSA: Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto

GLP-1: *glucagon-like peptide-1*

GGT: gama-glutamil transferase

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HDL: *high density lipoprotein*

IL: interleucina

JAM-1: *junctional adhesion molecule-1*

JNKs: *c-Jun N-terminal kinase*

LDL: *low density lipoprotein*

LPS: lipopolissacarídeos

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*

MyD-88: *myeloid differentiation primary response 88*

MMPs: *matrix metalloproteinases*

NF-κB: *nuclear factor kappa B*

NLRs: *NOD-like receptors*

NLRP-3: *Nod-like receptor protein-3*

PAI-1: *plasminogen activator inhibitor-1*

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*

PCR: proteína C reativa

PPAR- α : *peroxisome proliferator-activated receptor- α*

PRRs: *patterns recognition receptors*

RCV: risco cardiovascular

RISC: *RNA-induced silencing complex*

SM: síndrome metabólica

SREBP: *sterol regulatory element-binding proteins*

TGs: triglicerídeos

TIMP-1: *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*

TLRs: *toll-like receptors*

TNF- α : *tumor necrosis factor- α*

UFC: unidade de formação de colônia

VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*

VSMCs: *vascular smooth muscle cells*

VLDL: *very low-density lipoprotein*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro da doença hepática gordurosa não-alcoólica.....	14
Figura 2: Confluência dos fatores de risco para DHGNA e DCV	18
Figura 3: Doença hepática gordurosa não-alcoólica e doença cardiovascular.....	23
Figura 4: Biogênese dos microRNAs.....	25
Figura 5: Eixo fígado-intestino na progressão da DHGNA.	32
Figura 6: Ativação dos inflamassomas nas doenças hepáticas crônicas.	35
Figura 7: Interação entre a microbiota intestinal e a imunidade inata na patogênese das doenças hepáticas crônicas..	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para a síndrome metabólica.....	20
--	----

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo o abuso de álcool e as hepatites virais crônicas foram as principais causas de morbimortalidade por doenças hepáticas em todo o mundo, entretanto, nas últimas décadas, em decorrência do aumento da prevalência de obesidade, a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) tem sido reconhecida como uma das formas mais comuns de doenças hepáticas crônicas, particularmente nos países industrializados (1, 2). A DHGNA abrange um amplo espectro de doenças hepáticas em indivíduos que não consomem álcool em quantidades consideradas danosas ao fígado, ou seja, inferior a 20g de etanol/dia para mulheres e 30g/dia para os homens (1, 2). A história natural da DHGNA envolve desde a simples deposição de gordura no fígado, a esteatose hepática, podendo progredir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (2-4). Segundo Schuppan *et al.* 10-25% dos casos de esteatose hepática evoluem para EHNA, sendo que destes 2-3% dos casos progridem para o CHC (5).

Por sua vez, as doenças cardiovasculares (DCV) incluem um vasto grupo de condições clínicas que afetam o coração e os grandes vasos. As causas que aumentam a probabilidade de desenvolver essas doenças são denominadas de fatores de risco cardiovascular (RCV). A síndrome metabólica (SM), definida pela presença de obesidade central, acompanhada de hipertensão arterial sistêmica (HAS), glicemia de jejum alterada ou diabetes melito tipo-2 (DM-2) e dislipidemia, tem importante associação com a inflamação sistêmica e o aparecimento de DCV (6, 7). Além disto, a SM e a resistência insulínica são os principais fatores causais da EHNA

(6-8). Desta forma, não causa estranheza a associação entre a DHGNA e o aparecimento de DCV, posto que os fatores de risco para ambas são comuns (7).

O eixo fígado-intestino desempenha papel importante na homeostase e na doença. Estudos têm demonstrado que a disbiose intestinal, além de estar relacionada ao desencadeamento da DHGNA e sua progressão para EHNA, pode estar associada ao aparecimento de DCV (8-10). Os avanços recentes, possibilitam a realização de estudos mais aprofundados para a avaliação da microbiota intestinal e sua associação com a DHGNA e/ou DCV. Neste sentido, os modelos animais desempenham um papel vital na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em ambas as condições clínicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica

Atualmente, a DHGNA é considerada uma das formas mais comuns de hepatopatia e reconhecida como importante causa para o aumento das taxas de morbimortalidade relacionada ao fígado (8, 9, 11, 12). A esteatose hepática é caracterizada pela deposição de gordura em mais de 5% de hepatócitos, e pode progredir para EHNA, cirrose e CHC (1, 2, 6, 13, 14) (Figura 1). Os estádios iniciais da doença podem ocasionar inflamação crônica e reparação compensatória do tecido, posteriormente ocorre o acúmulo de colágeno e cicatriz (fibrose e/ou cirrose) (6, 15, 16). A cirrose está associada à perda progressiva da função orgânica e constitui a base para o desenvolvimento do CHC, embora o tumor possa ocorrer em fígado não-cirrótico (15, 17, 18). A DHGNA é assintomática até o surgimento de complicações em seu estágio final, podendo as alterações tornarem-se irreversíveis, quando o transplante hepático passa a ser a única opção terapêutica (3, 15, 19, 20). Assim, a identificação dos fatores de risco, diagnóstico precoce e intervenções são fundamentais para o manejo clínico da doença (2, 20).

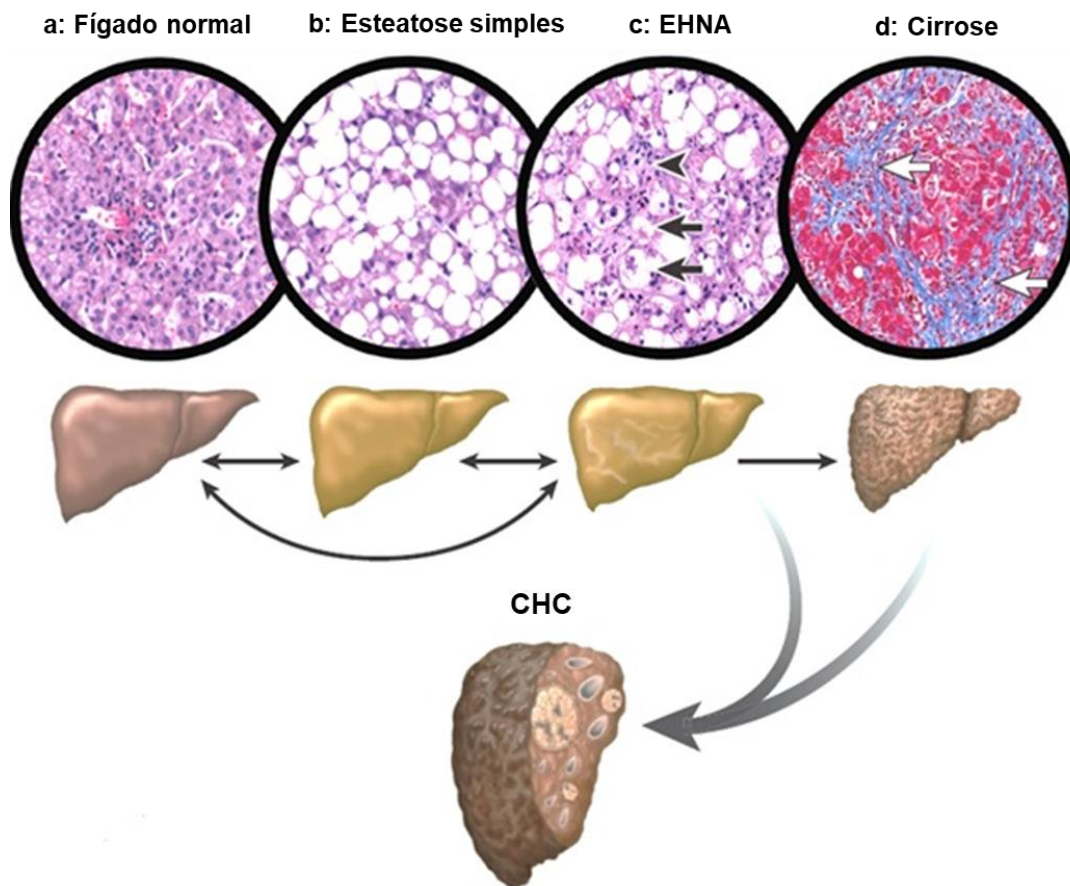


Figura 1: Espectro da doença hepática gordurosa não-alcoólica. As lesões iniciam-se geralmente com um quadro de esteatose hepática (b), podendo progredir para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), com infiltrado inflamatório e balonização (setas pretas na imagem), com presença ou não de fibrose (c), cirrose com deposição das fibras de colágeno nos espaços entre as células hepáticas (setas brancas na imagem) (d) e carcinoma hepatocelular (CHC). A doença pode progredir ou regredir conforme a ilustração das setas no painel. Fonte: Arab *et al.* (2018) (2).

A DHGNA tem distribuição mundial com prevalência variada, dependendo da população estudada e do método diagnóstico empregado (1, 16). Ela ocorre em indivíduos de todas as idades, entretanto, é mais comum nos adultos e tende a aumentar com a idade (1, 21). Estima-se que a prevalência da DHGNA seja algo em torno de 20-30% na população ocidental e 5-18% no Oriente (14). Sua prevalência na América do Sul tem sido estimada em 30% (22). Ademais, Goulart *et al.* relataram uma frequência de 34,4% de DHGNA em 195 sujeitos de pesquisa avaliados por ultrassonografia no Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA)-Brasil (23). Atualmente, a DHGNA é a segunda causa de transplante hepático nos Estados

Unidos (24), e é notável que seja ainda a causa que mais cresce nos últimos anos, naquele país (25, 26). Estimativas recentes dão conta que nos próximos anos a DHGNA vai se tornar mais frequente e mais grave, não só nos Estados Unidos, mas em todo o mundo (11, 12). De fato, até 2030 estima-se um incremento no número de casos de cirrose descompensada em 168%, de CHC em 137% e de 178% nos casos de morte hepática relacionados à DHGNA (12).

Em indivíduos com peso normal, a prevalência de DHGNA é de aproximadamente 16%, aumentando para 43 a 60% em pacientes com DM-2 e 91% em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica (1). Devido à alta prevalência na população obesa, a DHGNA tem sido considerada uma manifestação hepática da SM, além de ser considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCV (3, 7, 8, 27). Do ponto de vista etiológico, obesidade, resistência insulínica, DM-2 e dislipidemia são as causas primárias para o desenvolvimento dessa doença (1, 6, 14). Já o aparecimento secundário, inclui a exposição a xenobióticos, nutrição parenteral prolongada e algumas intervenções cirúrgicas, como transplante hepático e derivação jejunoileal (7, 14, 21).

Embora se conheçam os fatores predisponentes, os mecanismos que contribuem para a progressão da doença ainda não estão completamente elucidados (6, 27, 28). Algumas hipóteses têm sido levantadas na fisiopatologia da DHGNA e em sua evolução para EHNA, destacando a teoria dos múltiplos golpes proposta por Day & James (29, 30). A resistência à insulina seria a condição inicial para o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, uma vez que favorece a lipogênese e inibe a lipólise, aumentando significativamente o aporte de ácidos graxos a esse órgão (primeiro golpe), enquanto que o acúmulo progressivo de gordura atua como um sinalizador

para o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, processo inflamatório e endotoxemia crônica (segundo golpe), mecanismos fundamentais para a progressão da doença hepática (29, 30).

Para a caracterização da DHGNA são necessários dois aspectos: a presença de esteatose hepática documentada por análise histológica ou exames de imagem e a ausência de causas secundárias para o acúmulo de gordura hepática, tais como consumo excessivo de álcool, uso de medicamentos esteatogênicos e/ou diagnóstico de doenças hereditárias — entre outras, a doença de Wilson (21, 22). A presença de mais de 5% de hepatócitos esteatóticos, num corte de fígado é atualmente aceito como o critério mínimo para o diagnóstico histológico da esteatose hepática, já a EHNA é caracterizada pela presença de esteatose hepática, infiltrado inflamatório e lesão hepatocelular (balonização), com ou sem fibrose (2, 21).

O tratamento da DHGNA permanece controverso. Está bem estabelecido, entretanto, que a mudança no estilo de vida para um comportamento mais saudável, com perda de peso, controle dietético e atividade física, é um passo essencial no controle da DHGNA (1, 6). Apesar da complexidade dessa doença, a grande maioria dos casos de esteatose hepática podem ser reversíveis se o seu fator causal for eliminado. Vilar-Gomez *et al.* avaliaram prospectivamente um grupo de pacientes com diagnóstico de EHNA, submetidos a dieta hipocalórica combinada com exercício físico. Estes autores reportam, mudanças significativas nas características histológicas, relacionadas à doença, após 12 meses de estudo. Resolução da EHNA, com regressão de fibrose ocorreu de forma mais significativa em pacientes que tiveram maior perda de peso ($\geq 10\%$) (31). Medidas farmacológicas adotadas no tratamento da DHGNA têm focado os seus mecanismos alvo, utilizando fármacos que

promovam a sensibilização à insulina, redução de dislipidemia, inflamação e/ou estresse oxidativo (1, 32-35). Estudos clínicos de fase III estão sendo conduzidos para a avaliação de novas condutas terapêuticas para a DHGNA. Armstrong *et al.* demonstraram que o tratamento com liraglutida, agonista do peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide-1*) promoveu a resolução da EHNA, sem agravamento da fibrose em 39% dos pacientes em comparação com os 9% do grupo placebo (35). Ratziu *et al.* demonstraram que pacientes com EHNA, tratados com elafibranor (um agonista do receptor ativado por proliferador de peroxissoma - PPAR alfa e delta) apresentaram resolução da doença com melhora da fibrose, níveis de enzimas hepáticas, glicose, perfil lipídico, marcadores de inflamação e perfil de risco cardiometabólico em comparação ao grupo placebo (33). Friedman *et al.* conduziram um estudo clínico com o objetivo de avaliar o cenicriviroc, um antagonista duplo dos receptores de quimiocinas C-C tipos 2 e 5, para o tratamento da EHNA com fibrose hepática. Neste estudo, foi demonstrado que após 1 ano de tratamento, o dobro de indivíduos alcançaram a melhora da fibrose, não ocorrendo o seu agravamento em comparação ao grupo placebo (34).

2.2 Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica e Risco Cardiovascular

A DHGNA tornou-se uma das principais causas de doença hepática crônica em virtude do sedentarismo e dieta inadequada, principalmente pelo elevado consumo de alimentos industrializados (2, 19). Embora a conscientização entre os médicos tenha aumentado e a importância da doença tenha sido reconhecida, a realização de exames de triagem e o encaminhamento dos casos com suspeita a médicos hepatologistas é baixa, principalmente nas unidades de atenção primária à saúde.

Como resultado, a DHGNA é ainda subdiagnosticada. A DHGNA não está associada apenas ao aumento das taxas de morbimortalidade relacionada ao fígado, mas também está atrelada a maior mortalidade por DCV (8, 22). Mais especificamente, as evidências apontam que a DHGNA deve ser considerada um fator de risco independente e significativo para o aparecimento das DCV (3, 8).

Dentre os fatores associados ao RCV, incluem-se a idade, a presença de SM, o sedentarismo e o tabagismo, e dados recentes sugerem que muitos desses fatores estão relacionados a DHGNA, sendo o denominador comum para ambas as condições clínicas a SM (1, 7, 8, 36) (Figura 2).



Figura 2: Confluência dos fatores de risco para DHGNA e DCV. Diagrama de *Venn*, demonstrando a inter-relação dos fatores de risco. Abreviatura: DM-2: diabetes melito tipo-2. Fonte: adaptado de Azzam *et al.* (2015) (7).

A SM ocorre quando três dos cinco critérios descritos no Quadro 1 estão presentes (7). Aproximadamente 90% dos pacientes com EHNA apresentam pelo

menos uma das características da SM (37). Segundo estimativas, as DCV são responsáveis por 19-42% dos casos de mortalidade na DHGNA (38). Targher *et al.* relataram um aumento da prevalência de doenças coronarianas, cerebrovasculares e vasculares periféricas em pacientes com DHGNA e DM-2 em comparação com indivíduos sem essas alterações patológicas (39). Akin *et al.* demonstraram que crianças e adolescentes obesas com DHGNA podem desenvolver alterações ateroscleróticas precoces (40). Zhou *et al.* em uma metanálise, relatam estreita ligação entre a DHGNA e aterosclerose subclínica, orientando a realização de triagem e vigilância para que seja possível a avaliação precoce do quadro clínico, estratificação de risco e intervenção apropriada a longo prazo (41). No entanto, alguns trabalhos não confirmaram essa associação, incluindo dois grandes estudos de coorte com seguimento em longo prazo (42, 43). Stepanova *et al.* analisaram um banco de dados da América do Norte com informações coletadas entre os anos de 1988-1994. Nesse estudo foi demonstrada uma maior prevalência dos componentes da SM e DCV em pacientes com esteatose hepática em comparação ao grupo controle, no entanto não houve um aumento da taxa de mortalidade por DCV em pacientes com DHGNA ao longo dos 14 anos do estudo (42). Embora a relação entre a DHGNA e o aumento da prevalência das DCV parece ser robusta e consistente, por ter sido replicada em população de diferentes etnias, a contribuição da DHGNA para o aumento da incidência dessas doenças é controverso (8, 44).

Quadro 1: Critérios para a síndrome metabólica.

Critérios	Definição
Glicemia de jejum alterada	≥ 100 mg/dL ou diagnóstico prévio de DM.
Triglicerídeos	≥ 150 mg/dL ou tratamento específico para essa anormalidade.
HDL	< 40 mg/dL para homens/ < 50 mg/dL para mulheres ou tratamento específico para essa anormalidade.
Hipertensão arterial	Pressão arterial sistólica ≥ 130 mmHg, pressão arterial diastólica ≥ 85 mmHg ou tratamento prévio para diagnóstico de hipertensão.
Obesidade central	Circunferência dependente da etnia.

Abreviaturas: DM: diabetes melito, HDL: lipoproteína de alta densidade. Fonte: adaptado de Azzam *et al.* (2015) (7).

Os mecanismos fisiopatológicos da relação entre DHGNA e RCV não estão elucidados, sendo ainda debatido o que vem antes, se a DCV ocorre pela SM ou pela DHGNA (1, 8, 45). Em outras palavras, a DHGNA seria um fator de risco direto para o desenvolvimento da DCV? Não é fácil tentar discriminar estes fatores, uma vez que elementos confundidores estão envolvidos (7, 8). Assim, é recomendado a realização de exames de rastreamento de DCV em pacientes com DHGNA — e o inverso também se aplica.

Testes bioquímicos empregados na rotina clínica, podem ser utilizados na triagem destas condições clínicas, entre eles aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamil transferase (GGT), além da determinação do perfil lipídico (4, 46). Em aproximadamente, 70% dos casos de DHGNA os níveis séricos das transaminases são normais (4). A elevação nos níveis séricos de GGT tem sido considerada um fator de risco independente e preditor em longo prazo de DCV (4, 46).

Alterações no perfil lipídico sérico correlacionam-se significativamente com a gravidade da DHGNA, além de serem um fator de risco para o aparecimento das DCV. A elevação dos níveis séricos de triglicerídeos (TGs), colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) e com diminuição dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) são fatores de risco para DHGNA e DCV (4, 8). Com a finalidade de otimizar a capacidade preditiva do perfil lipídico os índices aterogênicos têm sido avaliados, em particular, as relações colesterol total/HDL, LDL/HDL, *etc.* (47-49).

Outros métodos que podem ser aplicados são os escores de risco de Framingham e ASCVD (do inglês, *atherosclerotic cardiovascular disease*), além de alterações nos níveis de proteína C reativa (PCR). A PCR, sintetizada nos hepatócitos sob estímulo primário de interleucina (IL)-6, é um marcador de fase aguda inflamatória e de disfunção endotelial (50). Induz à instabilização da camada fibrosa do ateroma, diminui a fibrinólise e promove a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1, do inglês *plasminogen activator inhibitor-1*) (50). O PAI-1 é sintetizado pelas células endoteliais, adipócitos, cardiomiócitos, fibroblastos e macrófagos. Níveis elevados de PAI-1 foram relatados como fator de risco para trombose e eventos cardiovasculares, seus níveis aumentam em decorrência de diversos estímulos metabólicos, tais como resistência insulínica, inflamação sistêmica e dislipidemia (45). Notavelmente, o PAI-1 também desempenha um papel importante na fibrose hepática através das metaloproteinases de matriz (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*), promovendo a degradação da matriz extracelular (45). Quando ativado o PAI-1 reduz a clivagem do plasminogênio em plasmina, ocasionando a diminuição da ativação das MMPs, que são um grupo de enzimas dependentes de plasmina, promovendo o

aumento da deposição de matriz extracelular no tecido hepático e iniciando o processo de fibrogênese (45) (Figura 3). Similar a função do PAI-1, o inibidor tecidual das metaloproteinases-1 (TIMP-1, do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) também atua na inibição das MMPs, promovendo maior deposição da matriz extracelular (51). O fibrinogênio também pode ser utilizado como um método de predição de eventos cardiovasculares (37, 38, 45, 52).

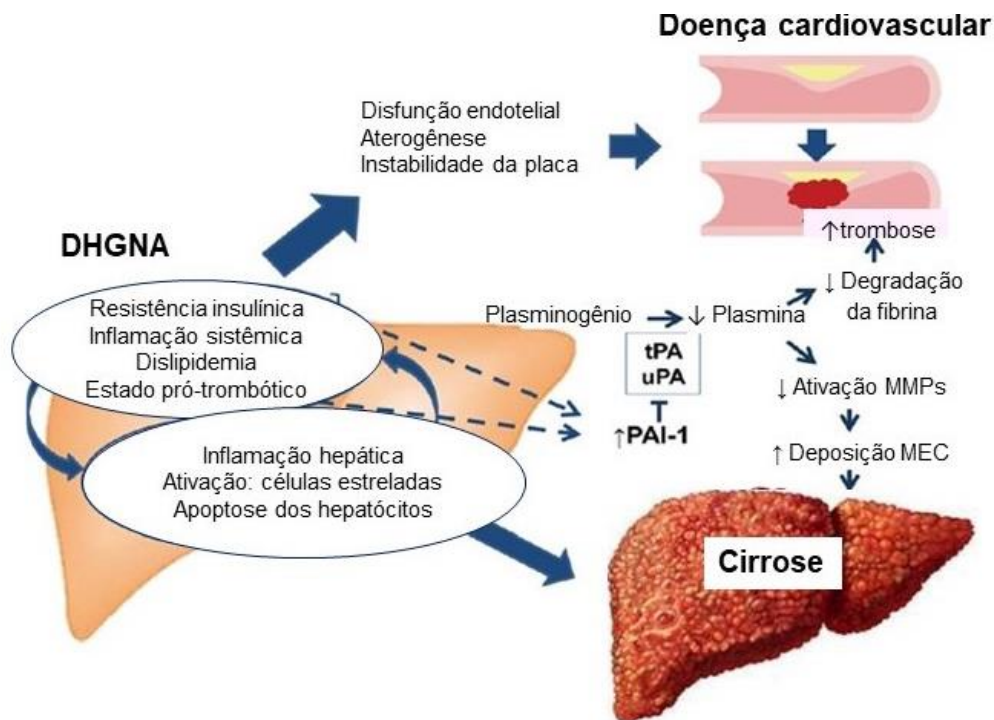


Figura 3: Doença hepática gordurosa não-alcoólica e doença cardiovascular. A DHGNA está associada a resistência insulínica, inflamação sistêmica, dislipidemia e mais recentemente a um estado pró-trombótico. A associação destes fatores aumenta a disfunção endotelial, aterogênese, ruptura da placa, trombose e oclusão dos vasos. A inflamação hepática na DHGNA ativa as células estreladas com deposição da matriz extracelular e lipoapoptose dos hepatócitos, ocasionando amplificação da resistência insulínica, inflamação sistêmica, dislipidemia e estado pró-trombótico. Níveis aumentados de PAI-1 estão independentemente associados à gravidade histológica da DHGNA e ao estado pró-trombótico, através da redução da ativação da plasmina mediada por tPA e uPA. Abreviaturas: DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica, MEC: matriz extracelular, MMPs: metaloproteinases de matriz, PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1, tPA: ativador de plasminogênio tecidual e uPA: ativador de plasminogênio uroquinase. Fonte: Barrera *et al.* (2014) (45).

O endotélio apresenta papel fundamental no início e na perpetuação do processo inflamatório crônico vascular, principalmente através de sua capacidade de secretar citocinas e moléculas de adesão (38). O endotélio normal não permite a aderência de leucócitos, porém, nas fases precoces da aterosclerose, as células endoteliais expressam moléculas de adesão, em função de estímulos inflamatórios. As selectinas, moléculas de adesão intercelular-1 e moléculas de adesão das células vasculares-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) têm sido identificadas na circulação sanguínea e servem como marcadores de RCV (8, 38). Em um estudo executado pelo grupo, com 44 pacientes ambulatoriais que realizaram transplante

hepático, comparados a controles saudáveis e pacientes com EHNA, foi demonstrado que após o período de seguimento esta população apresentou um alto risco de desenvolver aterosclerose, observado através dos parâmetros endoteliais e inflamatórios analisados, tais como PAI-1, VCAM-1, mieloperoxidase, e-selectina, interferon- γ , etc. (38). Além disso, podem ser utilizados exames de imagem, como a espessura da íntima carotídea e o escore de cálcio coronariano (53).

2.3 microRNAs: DHGNA e Risco Cardiovascular

Nos últimos anos diversos estudos, estão sendo realizados para avaliar o papel dos microRNAs em diversas comorbidades (54-60). Os microRNAs são moléculas de cadeia simples, de aproximadamente 18-24 nucleotídeos não codificantes (54, 55, 57). Grande parte dos microRNAs são gerados pela RNA polimerase II, em transcritos primários longos (pri-microRNA) que formam uma estrutura de forquilha (61). No núcleo das células a RNase III, também conhecida como complexo Drosha, processa este pri-microRNA em pré-microRNA que é a estrutura precursora dos microRNAs (61). Os pré-microRNA são exportados para o citoplasma através da exportina-5. No citoplasma o pré-microRNA é clivado pela enzima Dicer, também conhecida como RNase II, formando um microRNA maduro de dupla fita que será separado, por uma helicase de RNA (61). Este microRNA maduro será incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), o qual vai reconhecer e interagir com o mRNA alvo, ocasionando a repressão da expressão gênica ou seja, esta interação entre o microRNA maduro e o mRNA impossibilita que os ribossomos consigam traduzir a informação contida no mRNA, ocasionando a interrupção do processo inicial de tradução e/ou a indução de sua

clivagem. A outra fita complementar é degradada. A escolha de qual fita será o microRNA maduro e qual será degradada é de acordo com a estabilidade termodinâmica, dando-se preferência para a degradação da fita cuja a extremidade 5' possui menor estabilidade (Figura 4) (61). Esses processos podem acontecer devido ao reconhecimento e ligação deste microRNA as regiões específicas do mRNA alvo, tais como as extremidades 3'UTR e 5'UTR ou diretamente ao DNA.

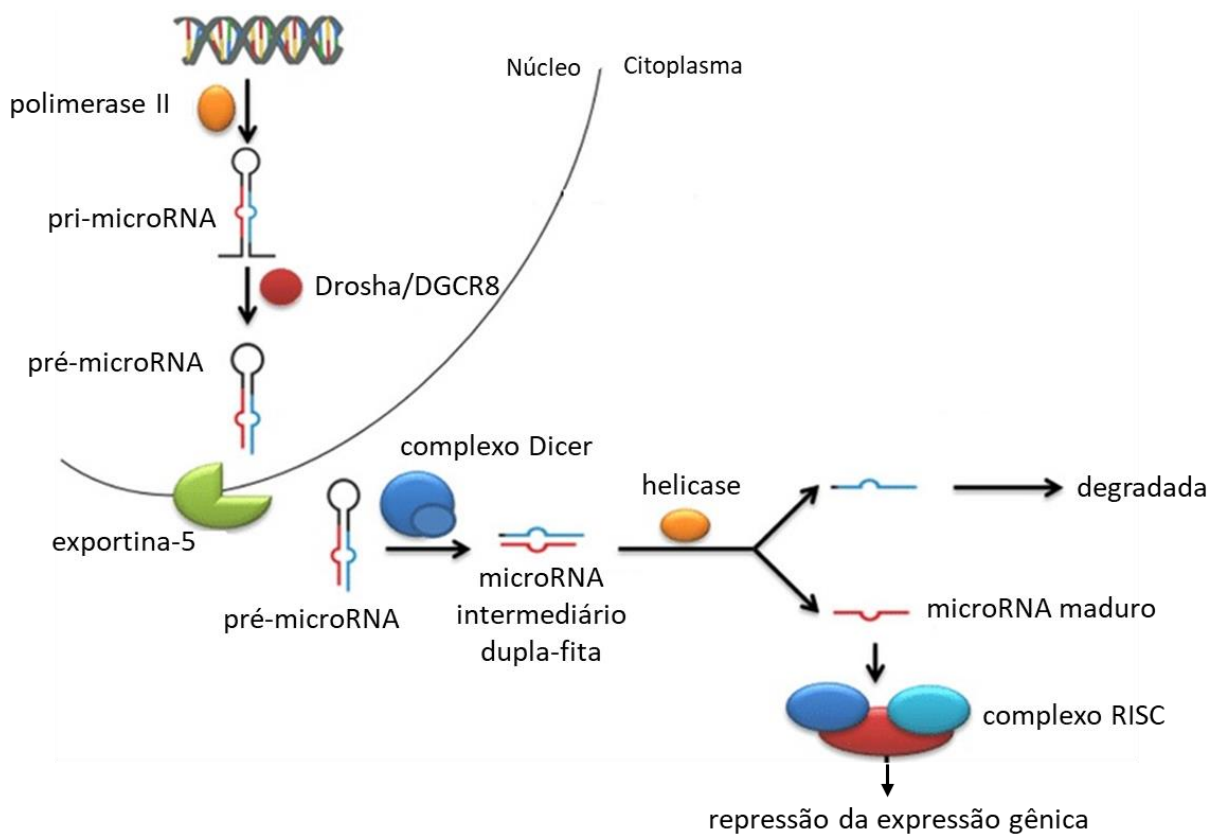


Figura 4: Biogênese dos microRNAs. O microRNA é transcrito primário em pri-microRNA pela RNA polimerase II, após é clivado pelo complexo Drosha a pré-microRNA no núcleo. O pré-microRNA é exportado para o citoplasma através da proteína exportina-5. No citoplasma o complexo Dicer, cliva o pré-microRNA em um microRNA maduro de dupla fita, as quais serão separadas por uma helicase de RNA, sendo uma das fitas degradada. A fita de microRNA madura é incorporada ao complexo RISC e irá interagir com mRNA alvo, tornando-se apto a regular a expressão do mesmo. Abreviaturas: RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA. Fonte: Samir *et al.* (2016) (62).

O crescente entusiasmo no uso dos microRNAs circulantes na prática clínica é explicado pela sua capacidade de refletir com precisão o estado fisiológico e/ou

patológico do tecido em que são derivados (57). Assim, os microRNAs circulantes podem ser considerados impressões digitais presentes no sangue que refletem a condição do tecido afetado, sendo ferramentas poderosas para a compreensão da fisiologia da doença (57). Até o momento, não está elucidado o papel dos microRNAs na biologia da DHGNA e não há um biomarcador não invasivo que seja confiável para distinguir os diferentes estádios da evolução da doença (57). Nos últimos anos, surgiram evidências de que os microRNAs estão envolvidos na regulação do colesterol e no metabolismo dos lipídeos, podendo estar associado ao desenvolvimento dos distúrbios metabólicos e DCV (55). Assim, os microRNAs circulantes podem ser utilizados como novos biomarcadores para complementar o diagnóstico da DHGNA e das DCV, auxiliando na decisão clínica e na abordagem terapêutica (63).

O miR-122 é o mais prevalente no tecido hepático dentre todos os microRNAs, e sua expressão é aumentada em ratos e em humanos durante o desenvolvimento embrionário (64). Ele desempenha importante papel na diferenciação e desenvolvimento dos hepatócitos (64). Foi demonstrado que o aumento da expressão do miR-122 circulante está associado à infecção pelo vírus da hepatite C e CHC (55, 57). É considerado um regulador positivo chave da lipogênese *de novo*, o que representa cerca de um quarto do depósito de gordura hepática nos pacientes com DHGNA e produz espécies lipídicas que conferem alto risco de desenvolvimento das DCV (55). Sua inibição promove a redução dos níveis séricos de colesterol e atenua a síntese hepática dos lipídeos (56).

Pirola *et al.* demonstraram que entre 84 microRNAs analisados em 47 pacientes com EHNA, 30 indivíduos com esteatose simples e 19 controles saudáveis a

expressão sérica dos miR-122, miR-192, miR-125b e miR-375 foram regulados positivamente em pacientes com EHNA e esteatose simples, sendo associada à gravidade histológica da doença (57). No entanto, apenas os níveis circulantes de miR-122 foram significativamente associados aos escores de fibrose, sendo que sua expressão no tecido hepático não se correlacionou com o estadiamento da doença. Estes autores, sugerem que a determinação da expressão gênica do miR-122 circulante pode ser utilizada como biomarcador no monitoramento da progressão da doença (57). Li *et al.* identificaram maior expressão do miR-122 circulante, no estágio inicial da síndrome coronariana aguda em pacientes (58). Há relato da associação entre a expressão do miR-122 circulante com a presença e gravidade da doença arterial coronariana (DAC) em pacientes (65).

O miR-33a e o miR-33b são codificados em íntrons dos genes que codificam as proteínas de ligação do elemento de regulação do esteroide (SREBP, do inglês *sterol regulatory element-binding proteins*)-1 e SREBP-2 (55). Este microRNA é considerado um regulador chave da síntese, transporte e secreção do colesterol, atua na repressão do gene transportador ATP-cassete de ligação-A1 (ABCA1, do inglês *ATP-binding cassette transporter-A1*), receptor que participa de maneira crítica na síntese de HDL e no transporte reverso de colesterol (55, 66). O miR-33 também é responsável pelo aumento dos níveis intracelulares dos lipídeos, visando a oxidação dos ácidos graxos e a ativação de vias de sinalização insulínica (66). O silenciamento do miR-33 é uma estratégia terapêutica atrativa contra algumas condições patológicas, tais como hipercolesterolemia e dislipidemia (66). No entanto, existe relato que o seu silenciamento prolongado em modelo experimental de dieta rica em gordura pode ocasionar esteatose hepática e hipertrigliceridemia (67).

No endotélio vascular, microRNAs estão presentes e controlam a resposta endotelial e estímulos moduladores da resposta angiogênica (68). Em particular, o miR-126 regula a migração de células inflamatórias, formação da rede capilar e a sobrevivência celular (68). Harris *et al.* demonstraram que a inibição do miR-126 promove a expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*) que ativa o fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) e conseqüentemente aumenta a expressão de VCAM-1 e a adesão de leucócitos às células endoteliais, processo importante no desenvolvimento da aterosclerose (69). A expressão reduzida de miR-126 em particular, pode ser detectada anos antes do aparecimento de DM-2, correlacionando-se com a manifestação de doença arterial periférica (68).

O miR-143 e miR-145 estão associados a regulação da contratilidade das células musculares lisas vasculares (VSMCs, do inglês *vascular smooth muscle cells*), modulando a dinâmica do citoesqueleto e possibilitando a resposta das VSMCs à lesão vascular (60, 70). Achados clínicos recentes demonstram que níveis elevados de miR-143 e miR-145 no plasma estão associados à hipertensão, DAC e infarto agudo do miocárdio, portanto podem ser utilizados como biomarcadores de DCV (70). Mehta *et al.* realizaram um estudo com o objetivo de explorar a expressão de alguns microRNAs circulantes em pacientes que possuíam DHGNA associada ou não a DAC, sendo demonstrada a maior expressão do miR-143 em pacientes com DHGNA e DAC quando comparado ao grupo de sujeitos com DHGNA sem DAC (60). O miR-145 também atua na limitação do desenvolvimento de fibrose hepática, bloqueando a ativação e a proliferação de células estreladas hepáticas. A expressão do miR-145 no

tecido hepático em modelo experimental de fibrose hepática demonstrou exercer um papel protetor contra a fibrogênese, através da via do NF-κB (59).

Em um estudo realizado por Wu *et al.* 327 indivíduos com dislipidemia foram estratificados em alto (n= 175), intermediário (n=40) e baixo (n=112) risco de apresentar DCV, além de serem recrutados 103 sujeitos controles (63). Neste estudo, foi demonstrado, maior expressão gênica de miR-186, miR-208b, miR-499 e miR-146a circulante em indivíduos com dislipidemia, nas diferentes categorias de RCV em comparação ao grupo controle. Os autores sugerem que os microRNAs podem ser utilizados como biomarcadores para o RCV (63).

O genoma humano contém centenas de microRNAs, porém suas funções fisiológicas e patológicas não estão completamente elucidadas (54, 68). Descobertas recentes possibilitam a utilização dos microRNAs em inúmeros setores, pois são considerados bons biomarcadores não-invasivos no diagnóstico precoce das doenças (57). Embora os avanços possuam grandes perspectivas na área da saúde, são necessárias mais pesquisas a fim de encontrar biomarcadores mais sensíveis e específicos.

2.4 Microbiota Intestinal e o Eixo Fígado-Intestino

Recentemente, evidências ligam a microbiota intestinal e as funções da barreira intestinal, indicando que as interações que ocorrem entre o eixo fígado-intestino podem desempenhar um papel crítico no início e na progressão das doenças hepáticas crônicas (71, 72). A microbiota do trato gastrointestinal humano contém aproximadamente 10^{14} unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias (6,

73, 74). A distribuição das bactérias dentro do trato gastrointestinal depende de fatores relacionados à espécie e às condições de colonização, tais como motilidade, pH, pressão de oxigênio, disponibilidade de nutriente e secreções do hospedeiro (sais biliares, enzimas) (75). Os aspirados de cólon podem revelar concentrações de até 10^{12} UFC/mL, enquanto que os aspirados de jejuno apresentam concentração menor, em torno de 10^3 - 10^4 UFC/mL (75). O intestino delgado abriga significativamente menos bactérias do que o cólon devido ao constante movimento peristáltico e à presença de ácido gástrico (75). Alterações na composição da microbiota intestinal, processo denominado de disbiose pode ser influenciado pela dieta, idade, peso corporal, medicamentos, doenças hepáticas, etc. (6, 73, 74).

O intestino e o fígado são os órgãos chave na absorção e metabolismo de nutrientes, sendo que os ácidos biliares, drogas e toxinas sofrem extensa circulação êntero-hepática (76). Existem vários mecanismos pelos quais a disbiose intestinal foi comprovada ou sugerida como contribuidor para a deposição de gordura no fígado, inflamação e fibrose, tais como a regulação da permeabilidade intestinal, inflamação de baixo grau e o equilíbrio imunológico, além de poder modular o metabolismo de ácidos biliares, melhorar o rendimento energético e aumentar a produção endógena de etanol por bactérias (6, 9, 77). Como decorrência de sua posição anatômica, o fígado recebe aproximadamente 70% de seu fornecimento sanguíneo a partir do intestino, através da veia porta, por isso é considerado a primeira linha de defesa contra antígenos derivados do intestino, tais como bactérias e subprodutos bacterianos (6, 9). A translocação bacteriana ocorre fisiologicamente e desempenha importante papel na patogênese e progressão das doenças hepáticas crônicas (75,

76). O indivíduo saudável é capaz de eliminar as bactérias translocadas, através da resposta do sistema imunológico (75).

Na presença da disbiose intestinal e na ruptura da barreira intestinal acontece o aumento da translocação de bactérias e subprodutos bacterianos, interrompendo a tolerância imunológica e estimulando as células hepáticas a desencadear uma resposta imune através dos receptores *toll like* (TLRs, do inglês *toll like receptors*) que atuam na eliminação destes antígenos (1, 2, 9, 19). O reconhecimento dos antígenos acontece por intermédio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *patterns recognition receptors*), dentre eles destacam-se os TLRs e os receptores do tipo NOD (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), responsáveis pela ativação de vias que induzem a transcrição de genes envolvidos na resposta imune inata (15, 71) (Figura 5).

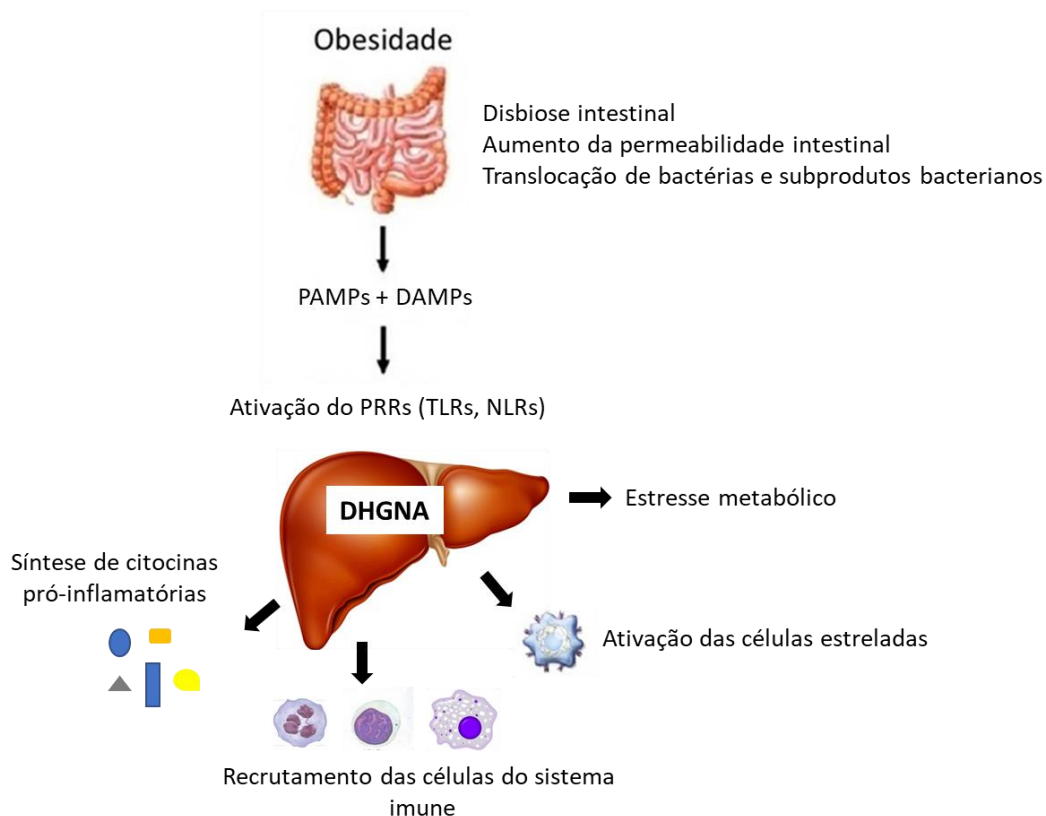


Figura 5: Eixo fígado-intestino na progressão da DHGNA. A obesidade está associada à disbiose intestinal e ao aumento da permeabilidade intestinal. Portanto, os produtos microbianos podem ser translocados através da circulação portal para o fígado. Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que promovem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células imunológicas, fibrogênese e estresse metabólico. Abreviaturas: DHGNA: doença hepática gordurosa não-alcoólica, NLRs: receptores do tipo NOD, TLRs: receptores *toll like*. Fonte: Bieghs *et al.* (2014) (15).

Os TLRs reconhecem as moléculas microbianas altamente conservadas, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern molecules*) (71). Atualmente, cerca de 13 membros dos TLRs são conhecidos em mamíferos e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõe as proteínas que os formam (15, 78). Por causa destas diferenças, cada TLR é capaz de reconhecer classes diferentes de moléculas biológicas, presentes em diversos microrganismos, por exemplo o TLR4 é capaz de reconhecer lipopolissacarídeos

(LPS) de bactérias gram-negativas, o TLR2 detecta bactérias gram-positivas através do reconhecimento dos componentes da membrana celular e o TLR9 é ativado pelos ligantes citidina-fosfato-guanosina (CpG, do inglês *cytidine-phosphate-guanosine*) presente no DNA das bactérias derivadas do intestino (15, 16, 78). A patogênese da DHGNA está associada à sinalização dos TLR4, TLR2 e TLR9 (15, 78). Após a estimulação com os ligantes correspondentes, os TLRs transmitem sinais através do fator de diferenciação mielóide-88 (MyD-88, do inglês, *myeloid differentiation primary response 88*) uma molécula adaptadora comum a todos os membros de TLRs, exceto TLR-3 (71, 79). Essa transdução de sinal induz à ativação do NF- κ B e c-jun N-terminal quinase (JNKs, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*), promovendo a síntese de mediadores pró-inflamatórios, tais como proteína quimiotática de monócitos (MPC-1, do inglês *monocyte chemotactic protein-1*), TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12 (2, 71, 79).

Os NLRs também são capazes de reconhecer os PAMPs e DAMPs, expressos principalmente em células apresentadoras de antígenos e células epiteliais, são proteínas solúveis que encontram-se no citoplasma das células (16, 32, 78). A ativação dos NLRs leva à montagem do inflamassoma. Vários membros dos NLRs, tais como NLRP-1, NLRP-3, NLRP-6, NLRC-4, *etc.* são capazes de formar o complexo inflamassoma e controlar a atividade da caspase-1 (16). O inflamassoma é um complexo multiprotéico, composto pela proteína NLR, o adaptador da proteína *speck-like* associada a apoptose com domínio de recrutamento de caspase (ASC, do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e a enzima caspase-1 (15, 32, 78, 80). Este complexo controla a síntese de algumas citocinas pró-inflamatórias. A montagem do complexo inflamassoma é composta por um processo de duas etapas (78). O primeiro passo é impulsionado pela sinalização gerada pelos

receptores: TLRs, TNFR ou IL-1R, que através do MyD-88 ativam o NF- κ B, promovendo a expressão dos componentes do inflamassoma, tais como NLRs, ASC, pró-caspase-1, pro-IL-1 β e/ou pro-IL-18 (78). O segundo sinal de ativação, proporcionado pela sinalização mediada pelos DAMPs, PAMPs, cristais de colesterol, *etc.* resulta na montagem do complexo inflamassoma, promovendo a clivagem da pró-caspase-1 em sua forma ativa a caspase-1 (78, 81). Uma vez ativada, essa enzima promove a maturação proteolítica e a ativação da IL-1 β e IL-18, desencadeando o processo inflamatório (78, 81) (Figura 6). A IL-1 β ativa, também pode estimular o seu receptor (IL-1R), levando à amplificação da sinalização do inflamassoma (78). Estas ILs estão intimamente relacionadas ao dano induzido pela resposta inflamatória e desempenham papel central na progressão da DHGNA (15, 80).

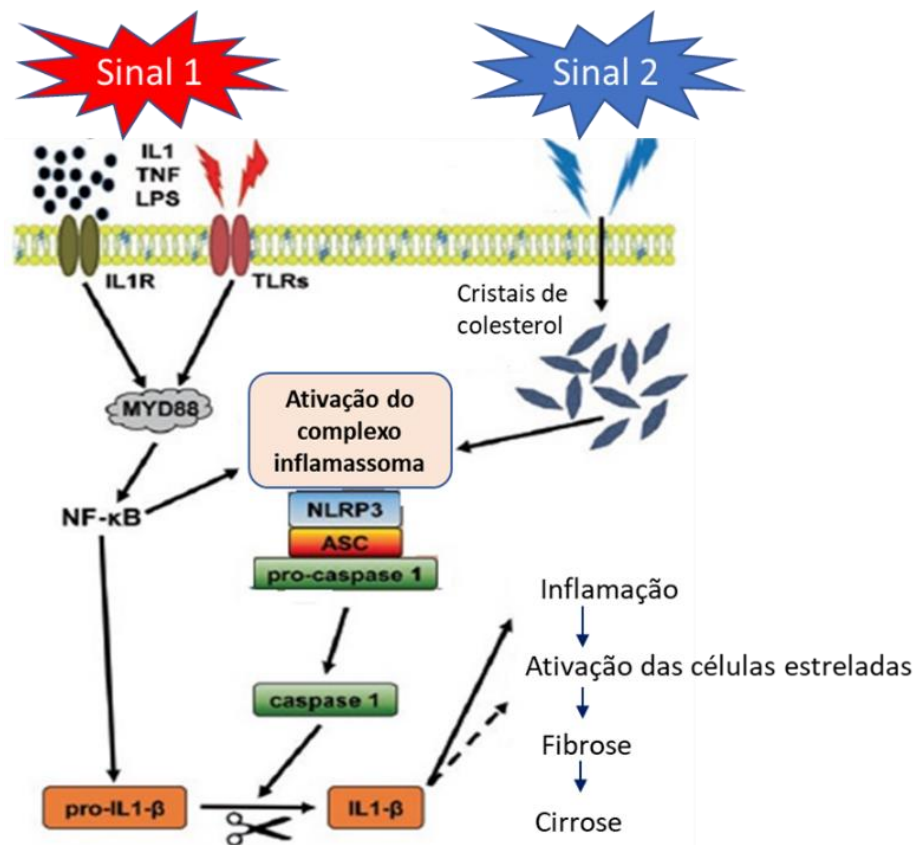


Figura 6: Ativação do complexo inflamassoma nas doenças hepáticas crônicas. A estimulação do inflamassoma é um processo de duas etapas em que a primeira resulta na regulação da expressão dos componentes do inflamassoma e a segunda desencadeia a sua ativação funcional. Abreviaturas: ASC: proteína *speck-like* associada a apoptose com domínio de recrutamento de caspase, IL: interleucina, LPS: lipopolissacarídeos, MyD-88: fator de diferenciação mielóide-88, NF-κB: fator nuclear kappa B, NLRP3: receptor do tipo *NOD-3*, TLRs: receptores *toll like*, TNFR: receptor do fator de necrose tumoral. Fonte: Farrell *et al.* (2018) (81).

Wree *et al.* identificaram um dos componentes do inflamassoma, o NLRP-3 (NLR com um domínio efetor de pirina (PYD) e uma proteína-3) como um contribuinte essencial dos danos hepáticos durante a EHNA (80). Conforme relatado, camundongos deficientes de NLRP-3 estão protegidos da EHNA induzida por dieta hiperlipídica (81). Esses achados têm implicações importantes para a compreensão da patogênese da DHGNA e pode levar a novas estratégias terapêuticas destinadas a interromper a progressão da esteatose hepática (80, 81). Outros estudos, relatam o papel do NLRP3 relacionado ao aparecimento das DCV, obesidade e DM-2 (82, 83).

2.4.1 Composição da Microbiota Intestinal

A DHGNA é uma doença multifatorial, em que fatores genéticos, inflamatórios e ambientais podem contribuir para sua patogênese (2, 84). Dentre os fatores ambientais, destaca-se a dieta, a qual exerce importante função na modulação da microbiota intestinal (2, 84). O interesse em investigar o papel da disbiose intestinal como um determinante de saúde e doença ganhou maior impulso na última década. De fato, a alteração da microbiota intestinal exerce um papel fundamental na patogênese e progressão das doenças hepáticas crônicas, aqui representada pela DHGNA, por promover a desregulação da imunidade inata em resposta à atividade pró-inflamatória persistente (3, 9, 85). O papel da microbiota intestinal é polimorfo, funcionando como uma ferramenta imunológica, metabólica e protetora para a saúde do hospedeiro. Na presença de uma disbiose intestinal, a saúde do hospedeiro fica comprometida, pois a microbiota é incapaz de manter o controle da homeostase local, aumentando a permeabilidade intestinal (85). O rompimento da homeostase epitelial intestinal ocasiona maior exposição hepática a antígenos exógenos e endógenos que impulsionam os danos através da interface do eixo fígado-intestino (6, 85) (Figura 7).

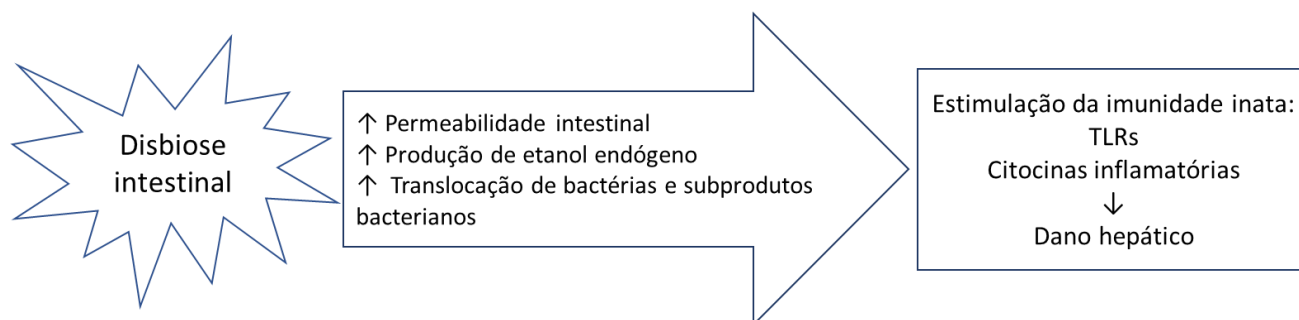


Figura 7: Interação entre a microbiota intestinal e a imunidade inata na patogênese das doenças hepáticas crônicas. Abreviaturas: LPS: lipopolissacarídeos, TLRs: receptores *toll like*. Fonte: Bibbó *et al.* (2018) (85).

A composição e a diversidade da microbiota podem ser avaliadas através da análise metagenômica, utilizando, por exemplo, o sequenciamento do gene 16S rRNA (84, 86, 87). Apesar da extensa variedade de bactérias, quatro filos principais estão presentes no intestino, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, sendo que até 90% destas bactérias pertencerem aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (6). A disbiose intestinal está sendo documentadas na DHGNA, tanto em pacientes como em modelos experimentais (6, 84, 86, 88).

Bactérias específicas têm sido associadas aos fenótipos da DHGNA (6). A primeira caracterização metagenômica da microbiota intestinal em pacientes com EHNA foi relatada por Mouzaki *et al.* no qual demonstraram menor percentagem de *Bacteroidetes* e aumento de *Clostridium coccoides* em pacientes com EHNA em comparação aos casos com esteatose simples e controles saudáveis (88). Boursier *et al.* confirmaram parcialmente estes dados, neste estudo os pacientes com EHNA possuíam uma quantidade maior de *Bacteroides* e uma menor quantidade de *Prevotella*, em comparação com indivíduos sem EHNA (86). Um estudo transversal prospectivo, comparando indivíduos magros com DHGNA a controles sem DHGNA, relatou significativamente maior e menor prevalência de bactérias gram-

negativas e gram-positivas, respectivamente no grupo DHGNA. Também foi reportado um aumento de 20% do filo *Bacteroidetes* e um decréscimo de 24% em *Firmicutes* nos indivíduos magros com DHGNA em comparação ao grupo controle. Curiosamente, entre as espécies pertencentes ao filo *Firmicutes*, foi relatado a redução significativa das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*. Estas bactérias são produtoras de ácidos graxos de cadeia curta e a sua diminuição pode resultar em deterioração da integridade intestinal e aumento da permeabilidade intestinal, fatores que contribuem na progressão da DHGNA (89). No entanto, outros relatos na literatura sugerem o aumento do filo *Firmicutes* e a redução do filo *Bacteroidetes*, na DHGNA (90, 91).

A disbiose intestinal, além de estar relacionada à etiologia da DHGNA e à sua progressão para EHNA, pode estar associada ao aparecimento de DCV, tais como aterosclerose, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (8). Estudos têm demonstrado que há depleção ou enriquecimento de certos grupos bacterianos em pacientes com DCV quando comparados a indivíduos saudáveis (87). A disbiose intestinal pode influenciar o aparecimento de DCV através do metabolismo da colina (10). Esse composto é considerado prejudicial, por alterar a maneira de como o colesterol e os esteróides são metabolizados e inibir o transporte reverso do colesterol, ocasionando o acúmulo de gordura nas paredes internas das artérias (10).

Entretanto, ainda não está elucidado se a disbiose está associada especificamente à DHGNA ou, mais geralmente, aos distúrbios metabólicos que podem ocorrer em paralelo, ocasionando a DCV. A hipótese mais consistente é que uma dieta desequilibrada é diretamente responsável pelo acúmulo de gordura no

fígado e contribui para a disbiose intestinal, intensificando a progressão da DHGNA e aumento do risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares.

2.5 Modelos Experimentais

Os modelos experimentais são úteis para o entendimento da doença e na avaliação de possíveis alvos terapêuticos, em estudos pré-clínicos (92, 93). Diversos mamíferos, podem ser utilizados no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da doença, mas os camundongos e ratos são utilizados com maior frequência (27). Os camundongos (C57BL/6J) e ratos *Wistar* e *Sprague Dawley* são geralmente os mais utilizados devido à sua predileção intrínseca em desenvolver obesidade, DM-2 e DHGNA (27). Em relação aos ratos, os *Sprague Dawley* são mais suscetíveis ao desenvolvimento de EHNA quando alimentados com dieta rica em gordura (94). A raça *Sprague Dawley*, foi originada a partir de uma estirpe albina híbrida. Estes animais conseguem manter uma resposta imune similar aos animais das linhagens que lhe derem origem e possuem baixa incidência de desenvolvimento de tumor espontâneo. Além de serem calmos, dóceis e de fácil manutenção.

Recentemente, Oseini *et al.* descreveram que o modelo experimental ideal para reproduzir a DHGNA em humanos seria aquele: (a) que não requeresse animais geneticamente modificados, pois na DHGNA em humanos não ocorrem essas deficiências específicas de gene, (b) que a obesidade fosse induzida por dieta, (c) que a dieta do animal contivesse ao menos um macronutriente similar àqueles consumidos pelos humanos, (d) que no modelo fosse induzida a adiposidade, resistência insulínica e dislipidemia, (e) que levasse à obesidade visceral e à inflamação sistêmica, (f) que

ativasse sinais celulares relevantes para a progressão e concordância histológica com a doença em humanos, (g) bem como gerasse uniformidade na avaliação de lipidômica e transcriptômica (92).

Vários modelos experimentais estão descritos na literatura, para a avaliação da DHGNA em seus diferentes estádios evolutivos, sendo eles nutricionais, genéticos e/ou farmacológicos, porém a grande maioria apresenta limitação na replicação dos fenótipos da doença em humanos (3, 27, 92, 93, 95-98). Portanto, a extrapolação dos dados obtidos dos modelos animais para a doença humana pode ser limitada pela dificuldade em reproduzir as mesmas condições clínicas e morfológicas (92, 93).

Os modelos genéticos de DHGNA utilizam animais que possuem alguma mutação espontânea para promover a doença (27, 28, 99, 100). Existem diversas intervenções que podem ser realizadas em diferentes genes com o objetivo semelhante, ou seja, gerar desequilíbrio na homeostasia dos lipídeos, para ocasionar a esteatose hepática (99). Uma das principais modificações genéticas utilizadas nestes modelos é a ativação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e colesterol, promovendo a lipogênese e a deposição de gordura no fígado, no entanto estes modelos induzem quase que exclusivamente a alterações bioquímicas da DHGNA e a adição de dietas modificadas é frequentemente necessária para a indução das alterações morfológicas encontradas na doença em humanos (96, 99). Tratam-se, porém, de modelos onerosos.

A indução da DHGNA também é possível em modelos experimentais, através de manipulação da dieta, de forma a promover a deposição de lipídeos no tecido hepático (3). Os modelos que utilizam dietas deficientes em aminoácidos essenciais, tais como

metionina e colina são amplamente descritos na literatura (101-104). Até recentemente, não se sabia que a deficiência de colina poderia ocorrer sob condições fisiopatológicas. Schnabl & Brenner, relatam que a dieta rica gordura, faz com que a microbiota intestinal converta a colina proveniente da alimentação em metilaminas, reduzindo conseqüentemente os níveis plasmáticos de fosfatidilcolina. Este fosfolípido é um constituinte importante da membrana celular das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), sem a sua presença os TGs não conseguem se acoplar a esta lipoproteína e passam a se acumular no tecido hepático ocasionando a DHGNA (105). Em paralelo, ocorre o aumento dos níveis plasmáticos de trimetilamina e o seu metabolismo hepático em trimetilamina-N-óxido, tem sido associado ao aparecimento de DCV, pois este composto é considerado prejudicial, por alterar a maneira de como o colesterol e os esteroides são metabolizados e inibir o transporte reverso do colesterol, ocasionando o acúmulo de gordura nas paredes internas das artérias (10, 106).

Os modelos experimentais que utilizam a dieta deficiente em metionina e colina (DDMC), também são utilizados para o estudo da doença, geralmente ocorre extensa inflamação e fibrose hepática precoce (2-6 semanas), alterações morfológicas observadas na EHNA, no entanto os animais não exibem quaisquer outras características metabólicas, incluindo obesidade, resistência insulínica e dislipidemia (28, 95, 104, 107, 108). Pelo contrário, os animais apresentam acentuada perda de peso (até 40% em 10 semanas) e diminuição da resistência insulínica (28, 95, 104, 107). Veteläinen *et al.* desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar os distúrbios metabólicos e patológicos em ratos alimentados com dieta deficiente em colina (DDC) e DDMC. Estes autores demonstraram que a utilização da DDC por sete

semanas foi capaz de induzir a esteatose sem complicação com características de SM. No entanto, os animais alimentados com DDMC apresentaram inflamação e fibrogênese (95). Os modelos de DDC e DDCM, são diferentes não somente pelos seus achados morfológicos, mas também pelas características metabólicas, tais como resistência insulínica, resposta inflamatória e estresse oxidativo (95).

Devido à associação entre a DHGNA e à SM, os animais estão sendo submetidos à dieta ocidental, visando induzir obesidade, resistência insulínica e dano hepático, semelhante ao fenótipo observado em humanos (28, 99). Nestes modelos, os animais são alimentados com uma dieta rica em gordura, sendo que 45-75% da ingestão calórica é derivada de gordura e/ou variações contendo gordura *trans* ou colesterol (28). Na maioria destes modelos, o grau de lesão hepática não é grave quando comparado aos modelos de DDMC (99). No entanto, a alimentação rica em gordura pode representar os hábitos alimentares prejudiciais da dieta ocidental e reproduzir a etiologia da DHGNA.

Um exemplo clássico de modelo que utiliza dieta rica em gordura para a avaliação da DHGNA e SM foi proposto por Lieber *et al.*, baseia-se em uma dieta líquida contendo gorduras (71%), carboidratos (11%) e proteínas (18%). Os animais alimentados com esta dieta, apresentaram alterações bioquímicas semelhantes ao perfil de EHNA em seres humanos. No entanto, os resultados histológicos hepáticos, demonstram sinais discretos de inflamação, esteatose leve e ausência de progressão da fibrose (109).

Asgharpour *et al.* desenvolveram um modelo experimental para o estudo da DHGNA, em seus diferentes estádios evolutivos (93). Foi realizado o cruzamento de

duas linhagens isogênicas de camundongos (C57BL/6J e 129S1/SvImJ), após os animais foram alimentados *ad libitum* com dieta rica em gordura e carboidratos e receberam água enriquecida com frutose, sendo observada a presença de esteatose hepática após 8 semanas de experimento, EHNA entre 16-24 semanas de indução e CHC após 52 semanas (93). Conforme relatado, este modelo imita todos os parâmetros fisiológicos, metabólicos, histológicos, transcriptômicos e terminais clínicos da EHNA humana e pode ser utilizado nos estudos pré-clínico de alvos terapêuticos para EHNA (93). No entanto, trata-se de um modelo oneroso devido a necessidade de aquisição desta linhagem específica de camundongos isogênicos.

Os modelos experimentais existentes de DHGNA, baseados em dieta rica em gordura podem resultar no surgimento espontâneo do CHC dirigido pela EHNA, após um longo período de alimentação (aproximadamente um ano) (3). O uso combinado de alimentação com aplicação de toxinas / carcinógenos podem acelerar significativamente o desenvolvimento de câncer de fígado experimental (3). Lima *et al.* desenvolveram um modelo para o estudo da EHNA, cirrose e CHC em ratos *Sprague Dawley*, através da oferta de dieta hiperlipídica deficiente em colina (DHDC, 35% de gordura total, enriquecida com 54% de ácidos graxos *trans*) associada a administração de dietil-nitrosamina na água (97). Estes autores demonstraram a presença de inflamação, balonização, fibrose e CHC no tecido hepático, analisado após 16 semanas de experimento (97).

O aumento progressivo na prevalência e incidência das DCV representa um problema de saúde pública de interesse crescente, desta forma estudos pré-clínicos têm sido realizados com a finalidade avaliar estratégias interventivas que vão desde procedimentos experimentais para testar novos implantes e/ou dispositivos, até

estudos mais específicos para análise dos mecanismos fisiopatológicos de determinadas DCV (110). Existem vários modelos para tratar complicações cardiovasculares, como aterosclerose e outras doenças cardíacas, onde patologias semelhantes foram recriadas em diferentes espécies, incluindo animais de grande porte ou pequeno (111, 112). O uso atual de pequenos roedores como o principal modelo de doenças humanas é generalizado, e eles são uma escolha popular de espécies por serem relativamente rentáveis, de fácil manutenção e podem fornecer grandes ninhadas (111). A capacidade de modificar geneticamente camundongos através da repressão ou superexpressão de genes de interesse tornou-os indispensáveis para desmembrar os mecanismos subjacentes às DCV (111).

A aterosclerose é um distúrbio inflamatório crônico, sendo a causa subjacente da maioria das DCV (112, 113). As células da parede do vaso e do sistema imune participam da aterogênese (112, 113). Um modelo experimental ideal para o estudo da aterosclerose não apenas compartilha os aspectos relacionados ao desenvolvimento da doença com os seres humanos, mas também a topografia das lesões (113). Além disso, os animais devem preferencialmente desenvolver a doença de maneira espontânea, após o consumo de uma dieta semelhante à dos seres humanos (113). Embora vários animais desenvolvam placas ateroscleróticas após uma dieta rica em colesterol, a topografia das lesões nem sempre é semelhante (113). Getz *et al.* relatam que nenhum modelo experimental é ideal para o estudo da aterosclerose, pois cada um tem suas próprias vantagens e limitações no que diz respeito à manipulação do processo aterogênico e à modelagem da doença (112). É importante ressaltar que a maioria dos modelos experimentais de aterosclerose, não desenvolvem espontaneamente as complicações observadas em humanos, como

ruptura da placa, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte súbita (113). Modelos ateroscleróticos dependem da geração de hipercolesterolemia, sendo ocasionado principalmente pela deficiência genética dos receptores de LDL ou apolipoproteína E (apoE) (111-113). Embora a deficiência de apoE em humanos seja rara, a ausência dos receptores LDL funcional em humanos, resulta em hipercolesterolemia familiar, o que está relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de DCV (112, 113).

Conforme já discutido, evidências demonstram que a DHGNA não é apenas uma doença hepática progressiva, mas também é responsável por ocasionar diversas complicações sistêmicas, dentre eles eventos cardiovasculares (2, 8, 34). Atualmente, não há medicamentos aprovados pelas agências reguladoras para o tratamento da EHNA, embora existam estudos clínicos de fase III sendo conduzidos, que provavelmente ainda não trarão medidas definitivas, uma vez que a combinação de drogas parece ser o futuro no controle da doença, e essas ainda estão em fase II (32, 34, 35). Portanto, permanece a necessidade de desenvolvimento de modelos experimentais pré-clínicos que reproduzam a DHGNA em humanos para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos neste processo, bem como para estudos terapêuticos pré-clínicos que visam à cardioproteção na DHGNA, um desfecho habitualmente não avaliado em ensaios clínicos.

3. JUSTIFICATIVA

A DHGNA é uma doença hepática progressiva que pode evoluir para cirrose e CHC, além de ser capaz de afetar vários órgãos extra-hepáticos, incluindo coração e sistema vascular. Os mecanismos fisiopatológicos putativos que ligam a DHGNA à DCV são complexos e não estão completamente elucidados. Estudos têm demonstrado que a disbiose intestinal está associada ao desenvolvimento de ambas as condições clínicas. De fato, a melhor compreensão das interações hospedeiro-microbiota intestinal certamente auxiliará no entendimento de como essa relação pode desvirtuar e contribuir para uma gama de transtornos imunológicos, inflamatórios e metabólicos, além de poder elucidar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes.

Considerando o caráter polimorfo da DHGNA e da DCV, os modelos animais podem ser bastante úteis na exploração destes mecanismos envolvidos. Portanto, a realização deste estudo justifica-se pela necessidade de modelos experimentais nutricionais que reproduzam os maus hábitos alimentares da população, culminando com o desenvolvimento de alterações bioquímicas, inflamatórias e histológicas observadas em humanos que permitissem avaliar, na sequência, a relação da microbiota intestinal, DHGNA e aumento do RCV, buscando uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo.

4. QUESTÕES DE PESQUISA

1 – O modelo experimental nutricional de DHGNA, induzido por DHDC é capaz de ocasionar alterações bioquímicas, inflamatórias e histológicas, similares às observadas em humanos?

2 - A alteração da composição da microbiota intestinal e a diminuição da diversidade bacteriana estão relacionadas com o aumento do RCV em um modelo de DHGNA induzida por DHDC em ratos?

5. HIPÓTESES

1 – A utilização da DHDC é capaz de induzir alterações bioquímicas, inflamatórias e histológicas similares às observadas na DHGNA em humanos.

2 - Os animais com DHGNA devem apresentar disbiose da microbiota, com alteração em sua composição, bem como diminuição da diversidade bacteriana e um maior risco de desenvolvimento de DCV.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo experimental nutricional de DHGNA capaz de induzir a alterações bioquímicas, inflamatórias e histológicas similares às observadas em humanos. Na sequência, avaliar fatores de RCV relacionados a DHGNA e correlacionar os dados com a composição da microbiota intestinal, em ratos submetidos à DHDC.

6.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver um modelo de DHGNA em ratos através da DHDC.
2. Avaliar os níveis séricos de glicose, AST, ALT, albumina e o perfil lipídico, para a caracterização do modelo experimental.
3. Analisar a concentração proteica no tecido hepático das citocinas inflamatórias: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e os índices inflamatórios, para a caracterização do modelo experimental.
4. Analisar a arquitetura hepática e a deposição das fibras de colágeno nos grupos em estudo.
5. Avaliar os índices aterogênicos e analisar a concentração sérica dos marcadores inflamatórios e disfunção endotelial: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, PAI-1, MCP-1 e TIMP-1 nos animais em estudo para a avaliação do RCV e processo inflamatório relacionado a DHGNA.

6. Determinar a expressão gênica no tecido hepático dos componentes inflamatórios e da via do inflamassoma: *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr9*, *Myd88*, *Il1b*, *Tnfa*, *Il18*, *Il6*, *Il10*, *Nlrp3*, *Casp1* e *Ppara*, nos animais em estudo.
7. Determinar a expressão gênica dos microRNAs circulantes: miR-186, miR-208b, miR-499, miR-146a, miR-33a, miR-122, miR-126, miR-143 e miR-145, relacionados ao RCV e/ou DHGNA nos animais em estudo.
8. Avaliar a composição e a diversidade bacteriana fecal dos animais em estudo.

7. ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS

7.1 Artigo I

Title: Pre-clinical model of non-alcoholic fatty liver disease, mimicking the disease condition in humans

List of abbreviations: ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, CD: choline-deficient, HCC: hepatocellular carcinoma, HDL: high-density lipoprotein, H&E: hematoxylin and eosin, HFD: high-fat diet, HFCD: high-fat and choline-deficient, IL: interleukin, LDL: low-density lipoprotein, MCD: methionine- and choline-deficient, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, NAS: NAFLD activity score, NASH: non-alcoholic steatohepatitis, SAF: steatosis-activity-fibrosis, TNF: tumor necrosis factor, VLDL: very low-density lipoprotein.

Acknowledgments: We would like to thank the Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for financial support.

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) comprises a spectrum of liver conditions ranging from hepatic steatosis to steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The pathophysiology of the disease is not clear, which calls for the use of animal models. However, models that mimic the metabolic changes that occur in humans are lacking. **Objective:** To develop an experimental dietary model of metabolic origin that causes obesity and glucose and lipid disorders and leads to

NAFLD. **Methods:** Adult male Sprague Dawley rats were randomized into two groups (n = 10): control group that was fed standard diet and intervention group that received a high-fat and choline-deficient (HFCD) diet for 16 weeks. At the end of the experiment, the rats were killed, and blood and tissues were collected for biochemical, inflammatory and histological evaluations. **Results:** The animals in the intervention group showed a significantly greater delta Lee index, abdominal circumference, abdominal adipose tissue accumulation and fresh liver weight compared to the control group. There were significant changes in serum levels of alanine aminotransferase, glucose and lipid profile and liver inflammation index in the intervention group. All animals in the intervention group developed histological lesions of NAFLD, steatosis or steatohepatitis. No histological changes were found in the control group. **Conclusion:** Animals given free access to HFCD diet for 16 weeks exhibited biochemical, inflammatory and histological alterations, corresponding to those observed in NAFLD in humans. Some characteristics of metabolic syndrome, such as increased visceral obesity, dyslipidemia and hyperglycemia were observed. Thus, this experimental model may contribute to the development of further studies aimed at understanding the pathophysiology of NAFLD and its development and of preclinical therapeutic studies as well.

Keywords: Animal model; Fatty liver; High-fat and choline-deficient; Non-alcoholic fatty liver disease.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common form of chronic liver disease in the world, with an estimated prevalence of 20% in the general

population and up to 95% among individuals with obesity (1, 2). It is characterized by abnormal accumulation of triglycerides in hepatocytes in subjects at risk (2, 3). The presence of hepatic steatosis, lobular inflammation and hepatocyte ballooning defines non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which can evolve through the different stages of fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) (2, 4, 5). In fact, NAFLD represents a major cause of terminal liver disease and HCC and is currently the second leading cause of liver transplantation in the United States (6). It is notable that NAFLD is the fastest growing cause in the last years (7, 8). Recent estimates suggest that the problem will become even more common and more serious not only in the United States but in the whole world (9, 10). With increased prevalence of NAFLD, it is expected that by 2030, there will be an increase in the number of cases of decompensated cirrhosis (168%), HCC (137%) and hepatic death (178%) secondary to the disease (9).

NAFLD is a hepatic manifestation of metabolic syndrome, associated with hyperinsulinemia or type 2 diabetes mellitus, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia and obesity and it is an independent risk factor for the development of cardiovascular diseases (2, 3, 11, 12). Excessive consumption of high-fat foods and beverages with high fructose concentrations and a sedentary lifestyle contribute to the onset of the disease (3). Despite its complexity, most cases of hepatic steatosis are reversible if the causative factor is eliminated (1, 13). To date, there is no specific therapy approved for NASH and the mechanisms that contribute to its progression are not yet fully elucidated (2, 5, 11, 14).

Accordingly, experimental models could be very useful in understanding the disease and in developing more effective therapeutic strategies. Various models of

NAFLD have been described, be they nutritional, genetic or pharmacological, but most show limitations in the replication of the disease phenotypes seen in humans (1,2,5,14, 15). Genetic models induce almost exclusively biochemical changes, and the addition of modified diets is often necessary to induce the morphological changes found in the disease in humans (3,14). Dietary models are widely used, but the animals do not always display the clinical, laboratory and histological characteristics of NAFLD in humans, including weight loss and decreased insulin resistance in some models (2, 3, 11, 14, 16, 17). Thus, the objective of this study was to develop an experimental dietary model of metabolic origin that reproduces the poor eating habits of the human population, culminating in the development of obesity and NAFLD.

Methods

Animals

In this study, we used 20 adult male Sprague Dawley rats weighing 280-350 g. The rats were randomized according to their weight and housed two animals per polypropylene cage, being kept in a controlled-temperature environment ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12-hour light/dark cycle.

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (protocol GPPG-HCPA No. 17-0021) in accordance with current Brazilian law (Law No. 11,794), using the minimum number of animals required to obtain reliable scientific data.

Experimental Design

The animals were acclimatized to the environment prior to the start of the experiment and were divided into two experimental groups: control group (n = 10) that received standard diet and intervention group (n = 10) that received high-fat and choline-deficient (HFCD) diet. Both groups were euthanized after 16 weeks.

Experimental Diets

The animals in the control group received a standard diet (Nuvilab CR-1, Quimtia S.A., Brazil) with an energy value of 2.93 kcal/g (information provided by the manufacturer). This diet consisted of 55.0% carbohydrates, 22.0% protein, 4.5% fat and 18.5% other constituents (fiber and vitamins). The animals in the intervention group received a HFCD diet (RH19576 - RHOSTER, Brazil) with an energy value of 4.3 kcal/g (information provided by the manufacturer). This product consisted of 54.5% carbohydrates, 14.0% protein and 31.5% fat (enriched with 54.0% trans fatty acids). The diet of the intervention group was chosen because it recapitulates many of the phenotypes observed in humans with NAFLD, including the accumulation of triglycerides in liver tissue. The diet offered to the animals of the control and intervention groups was replaced every two days. Both groups had water and feed supplied ad libitum during the experiment period.

Weight and Length Parameters

The animals were weighed (g) weekly for 16 weeks. Naso-anal length (cm) was measured in the initial and final week of the study for determination of delta Lee index. This index is calculated as the ratio between the cube root of body weight and the naso-anal length of animals multiplied by 10 (g/cm) (18). The abdominal circumference (cm) was measured when the animals were euthanized.

Collection of Blood, Liver Tissue and Abdominal Adipose Tissue

Prior to euthanasia, the animals were fasted for eight hours and then anesthetized with 5% isoflurane (Instituto BioChimico, Indústria Farmacêutica Ltda.). The animals were killed by cardiac exsanguination. Samples of blood were collected in BD Vacutainer SST-II Advance tubes and centrifuged at 15,000 g for 10 minutes at room temperature. The serum obtained was stored in a -80°C freezer until the biochemical analysis was performed.

The animals' liver was completely removed and weighed (g). Subsequently, fragments of the right and left lateral lobes were stored in a -80°C freezer or fixed in 10% formalin for the proposed analyses. We collected and weighed (g) abdominal adipose tissue.

Biochemical Analysis

Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, albumin, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglycerides were determined using Labmax 560 equipment.

Evaluation of Inflammatory Mediators

ELISA was used to evaluate hepatic concentrations of inflammatory mediators, interleukin (IL)-1 β (Thermo Scientific, USA), tumor necrosis factor (TNF)- α (Invitrogen, USA), IL-6 (Invitrogen, USA) and IL-10 (Invitrogen, USA). Liver tissue samples were homogenized in phosphate-buffered saline with protease inhibitor (Sigma, USA) on ice. All analyses were done in duplicate and according to the manufacturer's

instructions. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 450 nm (Zenyth 200 rt). Cytokine concentrations were determined using a standard curve. The data obtained were used to calculate the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, an inflammatory index. The results were expressed in pg/mg protein.

Quantitative Analysis of Liver Fat Deposition

Liver fat deposition was determined using the modified protocol of Gómez-Lechón et al. (19). In brief, liver tissue fragments were homogenized in phosphate buffer (20 mg tissue/mL) and incubated with 1 μ l of Nile Red solution (1 mg/mL in acetone) at 37°C for 15 minutes. Fluorescence was measured at 488 nm excitation and 550 nm emission (SpectraMax M3). The values obtained were normalized to total protein present in the homogenate (20). The results were expressed as fluorescence/ μ g protein.

Histological Analysis

Formalin-fixed liver tissue samples were embedded in paraffin and subjected to hematoxylin and eosin (H&E) and picosirius staining. Histopathological lesions were evaluated by steatosis-activity-fibrosis (SAF) algorithm, which were used for the diagnosis of NAFLD (21). The analysis was performed by an experienced pathologist, blinded to the experimental groups.

Fibrosis was quantified by morphometric analysis after picosirius staining. Ten randomly selected field images were obtained per animal, using the Olympus BX51 microscope, and the QCapture X64 program with 200X magnification was used for

determination of staining intensity. This evaluation was performed using the ImageJ program (version 1.51p).

Statistical Analysis

The symmetry of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. The Student t, Mann-Whitney U and chi-square tests complemented by adjusted residual analysis were performed. Longitudinal data analysis was carried out using the generalized estimating equations (GEE) method and multiple comparisons done with Fisher's least significant difference (LSD) procedure. Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation or median and minimum and maximum values. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed in the Statistical Package for Social Sciences 18.0 (SPSS Inc., USA).

Results

General Characteristics of the Dietary Model

Baseline weight of the animals in two groups was similar ($p = 0.962$), demonstrating homogeneity. From the first week after the introduction of HFCD, animals in the intervention group showed a gradual increase in body weight, and a significant difference between the groups became evident starting on the 6th week of the experiment (Figure 1A). The animals in the intervention group showed significantly greater ($p = 0.017$) delta Lee index (Figure 1B), abdominal circumference ($p < 0.001$) (Figure 2A) and abdominal adipose tissue accumulation ($p < 0.001$) (Figure 2B) in relation to the control group. There were no alterations in the macroscopic appearance of the liver in the control animals, whereas in the intervention group, the liver had a

yellowish and greasy appearance, characteristic of steatosis (Figure 2C-D). Fresh liver weight (Figure 2E) and liver weight/body weight ratio (Figure 2F) were significantly higher (both $p < 0.001$) in intervention animals compared to the control group.

Biochemical Parameters

In the evaluation of liver function, the intervention group showed significantly higher serum levels of ALT, glucose and lipids compared to the control group (Table 1). No significant difference was observed between the groups for serum levels of AST and albumin.

Liver Inflammatory Parameters

Hepatic concentrations of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β ($p = 0.001$) and TNF- α ($p = 0.008$) were significantly higher in the intervention group compared to the control group. No significant difference was observed between the groups for IL-6 concentration ($p = 0.736$). The intervention group showed a significantly lower concentration of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in relation to the control group ($p < 0.001$). The proportion of pro-inflammatory cytokines in relation to the anti-inflammatory cytokine in liver was significantly higher in the intervention group than in the control group for the three variables analyzed (Table 2).

Analysis of Fat Deposition in Liver Tissue

In the quantitative analysis of fat deposition, the animals in the intervention group (83.7 ± 24.5 fluorescence/ μg protein) showed a significantly greater ($p < 0.001$) accumulation of fat in liver tissue (approximately 18 times), compared to the control group (563.8 ± 178.3 fluorescence/ μg protein).

Histological Analysis

No abnormalities were seen in the liver tissue of the control group animals (Figure 3A-B), whereas the animals in the intervention group had predominantly microvesicular steatosis along with macrovesicular steatosis of moderate intensity, with little inflammatory activity and mild degree of fibrosis in some cases (Figure 3C-D). The quantification of collagen, using picrosirius staining, showed a significantly greater amount of connective tissue fibers in the intervention group in relation to the control group ($p < 0.001$) (Figure 3E). According to the SAF algorithm, four cases of NASH and six cases of NAFLD were detected in the intervention group. No histological changes were demonstrated in the control group for either classification (Table 3).

Discussion

We showed here that when animals were given free access to HFCD diet for 16 weeks, biochemical, inflammatory and histological alterations were induced, similar to those observed in NAFLD in humans. According to Oseini et al., the ideal experimental model for recapitulating NAFLD in humans would not require genetically modified animals, where obesity would be induced by diet instead, in which the diet would have at least one macronutrient like that consumed by humans (15). Furthermore, the model would induce adiposity, insulin resistance and dyslipidemia, leading to visceral obesity and systemic inflammation; in addition, the model should activate cell signals relevant to disease progression and show histological concordance with the disease in humans and uniformity in lipidomic and transcriptomic profiles. Except for the last two, which were not evaluated in this study, the described model meets the requirements related to the other aspects.

In the literature, there are various experimental models described for the study of NAFLD (2-5, 22, 23). However, the extrapolation of data obtained from animal models for human disease can be limited by the difficulty in reproducing the same clinical and morphological conditions. The genetic models of NAFLD use animals that have some spontaneous mutation that causes the disease (2, 3, 11, 24). There are several interventions that can be performed in different genes with a similar objective, that is, to generate an imbalance in lipid homeostasis, so that hepatic steatosis develops (3). One of the main genetic modifications used in these models is the activation of genes involved in the synthesis of fatty acids and cholesterol, promoting lipogenesis and the deposition of fat in the liver; however, the introduction of modified diets is often necessary for the induction of morphological alterations found in human disease (3). Moreover, genetic models are costly.

The induction of NAFLD is also possible in experimental models through the manipulation of diet, to promote the deposition of fat in liver tissue. Models that use diets deficient in essential amino acids, such as methionine and choline, are widely described in the literature (25-28). Depriving animals of these nutrients impairs hepatic secretion of very low-density lipoproteins (VLDL), resulting in accumulation of hepatic fat, oxidative stress and cell death, causing mild hepatic inflammation and fibrosis (1, 2, 28). A methionine- and choline-deficient (MCD) diet exacerbates the damage, causing extensive inflammation and early liver fibrosis (2-6 weeks), characteristics of NASH, but the animals do not exhibit any other metabolic characteristics that are observed in NAFLD, including obesity, insulin resistance and dyslipidemia (1, 11, 16, 29, 30). On the contrary, the animals show significant weight loss and decreased insulin resistance (1, 11, 29, 30). Due to the association between NAFLD and

metabolic syndrome, animals can be subjected to a Western-style diet, which causes obesity, insulin resistance and liver damage (3, 11). In these models, animals are fed a high-fat diet (HFD) in which 45-75% of the caloric intake is derived from fat and/or variations containing trans-fat or cholesterol (11). In most HFD models, the degree of liver damage is not severe compared to the MCD model (3). However, HFD may reflect the harmful eating habits of the Western diet and reproduce the etiology of NAFLD. In our study, a HFCD diet resulted in increased fat deposition in the liver and the phenotypes observed were similar as in NAFLD in humans.

Visceral obesity, hyperglycemia, dyslipidemia, changes in liver function tests, systemic and histological inflammation are required for NAFLD and it is questionable whether the results of an experimental model that do not fully meet these conditions can be extrapolated to humans (15, 25). The changes described in this study in relation to body weight, fresh liver weight, delta Lee index, abdominal circumference and the amount of abdominal adipose tissue in the intervention group rats reinforce its usefulness. Raubenheimer et al. reported that a choline-deficient (CD) diet did not influence body weight gain or fat deposition but was able to increase liver triglyceride content (30). Wu et al. demonstrated that CD decreased body weight gain and fat mass (31). The difference between the results obtained in these studies is probably due to discrepancies in animal models and feeding protocols. In our study, we used Sprague Dawley rats, which have an intrinsic propensity for the development of obesity and NAFLD, when on a HFCD diet continuously for 16 weeks.

Biochemical changes and altered glucose and lipid profile were also found in the intervention group in relation to the control. Veteläinen et al. demonstrated that Wistar rats receiving CD diet for seven weeks showed changes in serum levels of triglycerides

and cholesterol, whereas animals fed MCD diet had serum levels below the limit of detection (1). According to Wu et al., in addition to affecting the body weight of the animal, CD also decreases fasting plasma glucose, a finding that is not in line with the results obtained in the present study (31).

Under physiological conditions, hepatic cytokine production is absent or minimal. However, pathological stimuli induce hepatic cells to produce inflammatory molecules that play a key role in the progression of NAFLD (32). In this study, hepatic concentrations of IL-1 β , TNF- α and IL-6 were higher in the intervention group compared to control. Bortolin et al., when testing different obesogenic diets for 18 weeks did not observe a significant difference in the inflammatory index of TNF- α (17). Veteläinen et al. demonstrated an increase in the hepatic concentration of TNF- α in animals fed CD and MCD diet after one week. However, after seven weeks, the concentration of this inflammatory mediator increased about tenfold in animals fed MCD and remained unchanged in those fed CD diet (1). Kishida et al., demonstrated that mice fed HFCD (58.0% fat) had serum TNF- α changes at weeks 4 and 8 of the experiment compared to the control group. However, serum IL-6 changes were observed only by the 16th week (28).

The animals fed HFCD showed, after 16 weeks, steatosis of moderate intensity, with little inflammatory activity and a mild degree of fibrosis. It is well described in the literature that the dietary model of MCD diet is often used for the histological study of NASH in animals due to rapid progression to fibrosis (11, 26, 29, 32). A classic example of a model that uses HFD for the evaluation of NAFLD and metabolic syndrome was proposed by Lieber et al. and is based on a liquid diet containing fat (71%), carbohydrates (11%) and protein (18%). Animals fed this diet showed similar

biochemical changes as the NAFLD profile in humans, and histopathological evaluation showed discrete signs of inflammation and mild steatosis and absence of fibrosis progression (33). Asgharpour et al., developed a model through the crossing of two isogenic lines of mice (C57BL/6J and 129S1/SvImJ), and after the animals were fed ad libitum a high fat and carbohydrate diet and received water with a high fructose-glucose. These authors report the development of hepatic steatosis occurred after 8 weeks, NASH after 16-24 weeks, and HCC after 52 weeks (5). This model reproduces all the physiological, metabolic, histological and transcriptomic parameters of the human disease and can be used in preclinical studies of therapeutic targets (5). In agreement with our findings, Cortez-Pinto et al. reported that mice fed a HFCD (35% total fat, 54% trans-fatty acid enriched) diet for 16 weeks developed histological lesions compatible with NASH and a significantly higher percentage of liver fibrosis compared to the control group (4). Marinho et al. reported that the induction of NAFLD in mice through HFD for 16 weeks caused altered liver function tests, increased expression of inflammatory cytokines and steatosis, as in the present study (34). In this study, the animals did not develop advanced liver disease or HCC. Dietary models of HFD or HFCD require a relatively long period - usually about 1 year - to produce HCC and are not recommended because of the high maintenance cost (28).

In conclusion, the dietary model of NAFLD of metabolic origin described in this study is easy to establish and perform, in addition to being able to recapitulate the disease characteristics in humans. In this model, characteristics of metabolic syndrome, such as obesity, dyslipidemia and hyperglycemia, were observed. Therefore, the use of this experimental model may contribute to the development of

further studies aimed at diagnosis at the molecular level and the identification of possible therapeutic targets of NAFLD.

References

1. Veteläinen, R.; van Vliet, A.; van Gulik, TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22 (9), 1526-33.
2. Van Herck, MA.; Vonghia, L.; Francque, SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients* 2017, 9 (10).
3. Sanches, SC.; Ramalho, LN.; Augusto, MJ.; da Silva, DM.; Ramalho, FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int* 2015, 2015, 574832.
4. Cortez-Pinto, H.; Borralho, P.; Machado, J.; Lopes, M.T.; Gato, I.V.; Santos, A.M.; et al. Microbiota Modulation with Synbiotic Decreases Liver Fibrosis in a High Fat Choline Deficient Diet Mice Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *GE Port J Gastroenterol* 2016, 23 (3), 132-141.
5. Asgharpour, A.; Cazanave, S.C.; Pacana, T.; Seneshaw, M.; Vincent, R.; Banini, B.A.; et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 2016, 65 (3), 579-88.
6. Wong, R.J.; Aguilar, M.; Cheung, R.; Perumpail, R.B.; Harrison, S.A.; et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* 2015, 148 (3), 547-55.
7. Cholankeril, G.; Wong, R.J.; Hu, M.; Perumpail, R.B.; Yoo, E.R.; Puri, P.; et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the US: Temporal Trends and Outcomes. *Dig Dis Sci* 2017, 62 (10), 2915-2922.

8. Younossi, Z.; Stepanova, M.; Ong, J.P.; Jacobson, I.M.; Bugianesi, E.; Duseja, A.; et al. Non-alcoholic Steatohepatitis is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018.
9. Estes, C.; Razavi, H.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Sanyal, A.J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018, 67 (1), 123-133.
10. Estes, C.; Anstee, QM.; Arias-Loste, M.T.; Bantel, H.; Bellentani, S.; Caballeria, J.; et al. Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol* 2018.
11. Lau, J.K.; Zhang, X.; Yu, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol* 2017, 241 (1), 36-44.
12. Francque, S.M.; van der Graaff, D.; Kwanten, W.J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 2016, 65 (2), 425-43.
13. Rinella, M. E.; Green, R. M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004, 40 (1), 47-51.
14. Honda, T.; Ishigami, M.; Luo, F.; Lingyun, M.; Ishizu, Y.; Kuzuya, T. Branched-chain amino acids alleviate hepatic steatosis and liver injury in choline-deficient high-fat diet induced NASH mice. *Metabolism* 2017, 69, 177-187.
15. Oseini, A.M.; Cole, B.K.; Issa, D.; Feaver, R.E.; Sanyal, A.J. Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int* 2018, 12 (1), 6-16.
16. Chiba, T.; Suzuki, S.; Sato, Y.; Itoh, T. Umegaki, K. Evaluation of Methionine Content in a High-Fat and Choline-Deficient Diet on Body Weight Gain and the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS One* 2016, 11 (10), e0164191.

17. Bortolin, R.C.; Vargas, A.R.; Gasparotto, J.; Chaves, P.R.; Schnorr, C.E.; Martinello, K.B.; et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond)* 2017.
18. de Moura, R.F.; Ribeiro, C.; de Oliveira, J.A.; Stevanato, E.; de Mello, M.A. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr* 2009, 101 (8), 1178-84.
19. Gómez-Lechón, M.J.; Donato, M.T.; Martínez-Romero, A.; Jiménez, N.; Castell, J.V.; O'Connor, J. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007, 165 (2), 106-16.
20. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-54.
21. Bedossa, P.; Poitou, C.; Veyrie, N.; Bouillot, J. L.; Basdevant, A.; Paradis, V.; et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012, 56 (5), 1751-9.
22. de Lima, V.M.; Oliveira, C.P.; Alves, V.A.; Chammas, M.C.; Oliveira, E.P.; Stefano, J.T.; et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008, 49 (6), 1055-61.
23. Spruss, A.; Kanuri, G.; Wagnerberger, S.; Haub, S.; Bischoff, S.C.; Bergheim, I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2009, 50 (4), 1094-104.
24. Takahashi, Y.; Soejima, Y.; Fukusato, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012, 18, 2300-8.
25. Ikawa-Yoshida, A.; Matsuo, S.; Kato, A.; Ohmori, Y.; Higashida, A.; Kaneko, E.; et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol* 2017, 98 (4), 221-233.

26. Larter, C.Z.; Yeh, M.M.; Williams, J.; Bell-Anderson, K.S.; Farrell, G.C. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol* 2008, 49 (3), 407-16.
27. Matsumoto, M.; Hada, N.; Sakamaki, Y.; Uno, A.; Shiga, T.; Tanaka, C.; et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 2013, 94 (2), 93-103.
28. Kishida, N.; Matsuda, S.; Itano, O.; Shinoda, M.; Kitago, M.; Yagi, H.; et al. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. *BMC Gastroenterol* 2016, 16 (1), 61.
29. Machado, M.V.; Michelotti, G.A.; Xie, G.; Almeida Pereira, T.; de Almeida, T. P.; Boursier, J. et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One* 2015, 10 (5), e0127991.
30. Raubenheimer, P.J.; Nyirenda, M.J.; Walker, B.R., A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2006, 55 (7), 2015-20.
31. Wu, G.; Zhang, L.; Li, T.; Lopaschuk, G.; Vance, D.E.; Jacobs, R.L., Choline Deficiency Attenuates Body Weight Gain and Improves Glucose Tolerance in ob/ob Mice. *J Obes* 2012, 2012, 319172.
32. Luo, X.Y.; Takahara, T.; Kawai, K.; Fujino, M.; Sugiyama, T.; Tsuneyama, K.; et al. IFN- γ deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013, 305 (12), G891-9.
33. Lieber, C.S.; Leo, M.A.; Mak, K.M.; Xu, Y.; Cao, Q.; Ren, C.; Ponomarenko, A.; DeCarli, L. M., Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004, 79 (3), 502-9.
34. Marinho, P.C.; Vieira, A.B.; Pereira, P.G.; Rabelo, K.; Ciambarella, B.T.; Nascimento, A.R.; et al. Capybara Oil Improves Hepatic Mitochondrial Dysfunction,

Steatosis, and Inflammation in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.
Evid Based Complement Alternat Med 2018, 2018, 4956079.

Figure Legends

Figure 1: (A) Determination of weight parameters ($p < 0.001$): a significant difference between groups is observed starting on the sixth week according to the LSD multiple comparisons test. (B) Delta Lee index, *significant effect of the high-fat and choline-deficient diet ($p = 0.017$). Data expressed as mean \pm standard deviation.

Figure 2: (A) Abdominal circumference, (B) visceral adipose tissue mass, (C) macroscopic appearance of liver in the control group, (D) macroscopic appearance of liver in the intervention group, (E) liver weight and (F) liver weight/body weight ratio of the animal. *significant effect of the high-fat and choline-deficient diet ($p < 0.001$). Data expressed as mean \pm standard deviation, Student *t*-test.

Figure 3: Liver histological evaluation. Image referring to the control (A) and intervention (C) groups, H&E staining and both at 40X magnification. Picrosirius staining in the control (B) and intervention (D) groups, both at 10X magnification. (E) Quantification of collagen fibers. Data expressed as median (25th-75th percentile), Mann-Whitney *U* test. *significant effect of the high-fat and choline-deficient ($p < 0.001$).

Figure 1: A and B

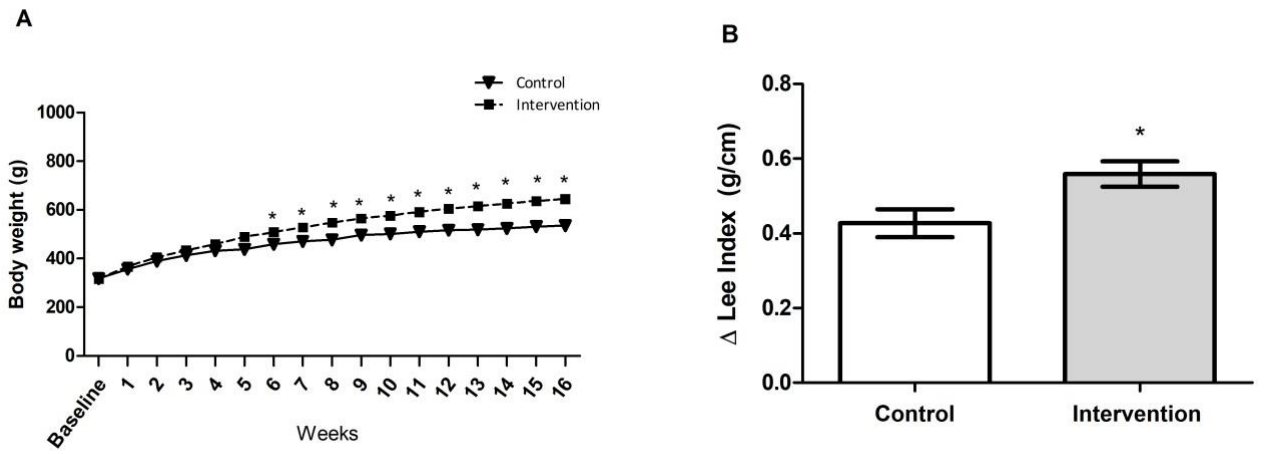


Figure 2: A – F

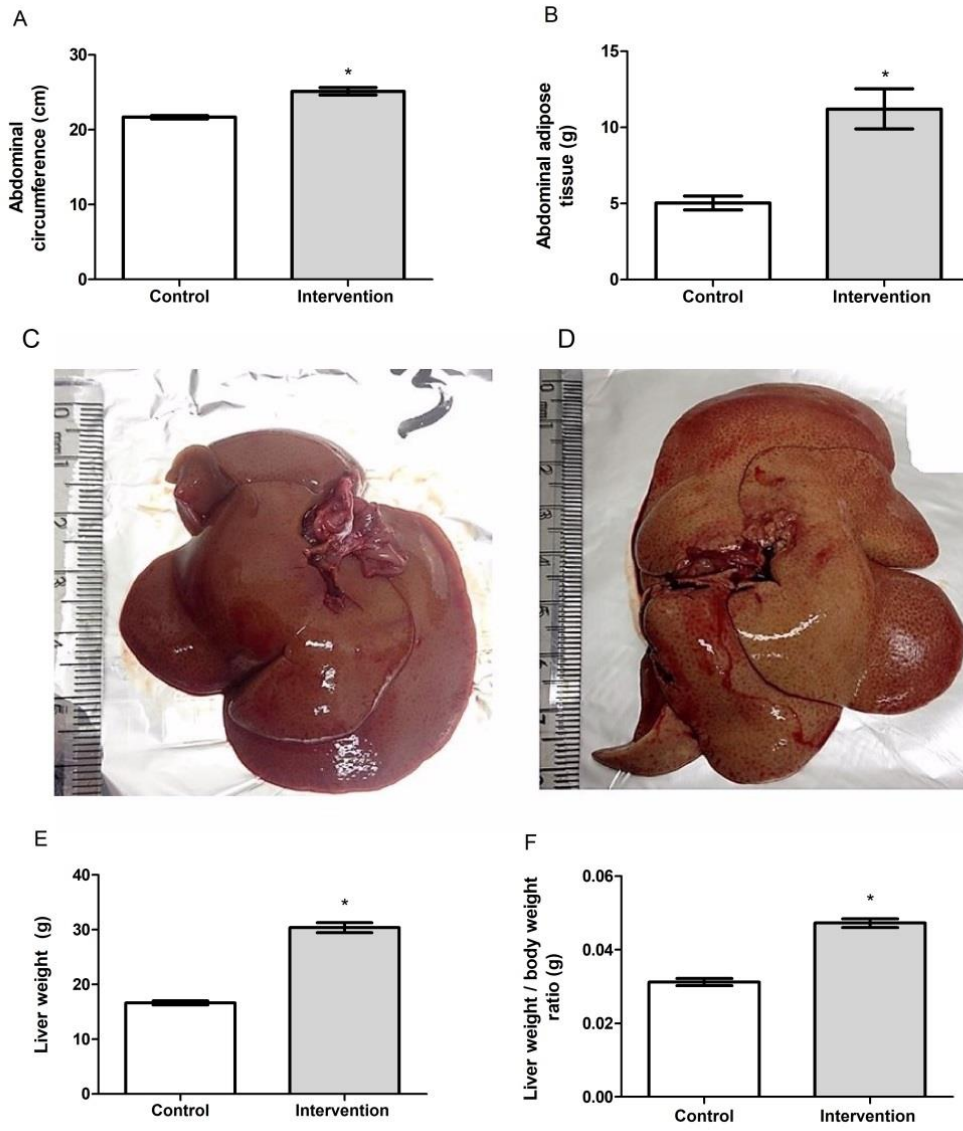
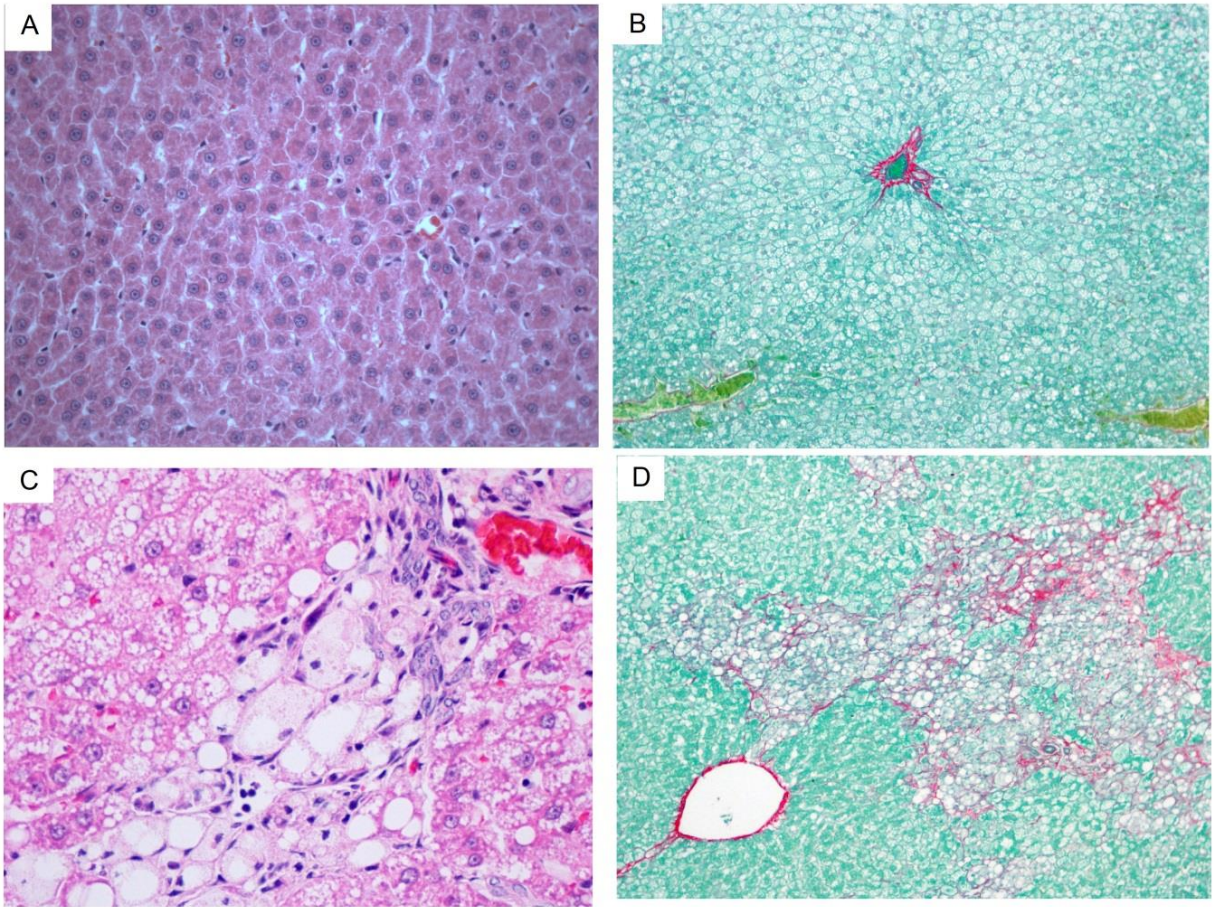


Figure 3: A - E



E

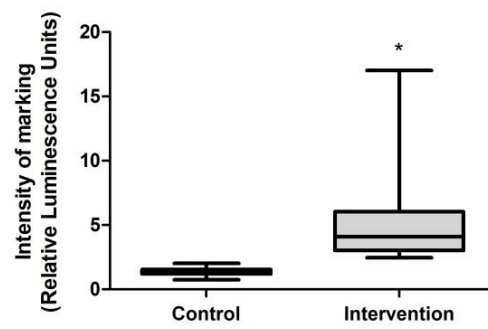


Table 1: Biochemical parameters

Variable #	Control (n=10)	Intervention (n=10)	<i>p</i> *
ALT (U/L)	27.5 (± 9.0)	48.0 (± 20.7)	0.010
AST (U/L)	76.1 (± 18.9)	73.4 (± 17.8)	0.745
Albumin (g/dL)	2.2 (± 0.21)	2.1 (± 0.33)	0.532
Glucose (mg/dL)	278.2 (± 56.8)	353.4 (± 64.3)	0.013
Total cholesterol (mg/dL)	78.7 (± 11.7)	101.8 (± 27.5)	0.033
LDL cholesterol (mg/dL)	16.7 (± 2.7)	23.4 (± 6.63)	0.011
HDL cholesterol (mg/dL)	62.7 (± 31.3)	31.3 (± 6.6)	0.006
Triglycerides (mg/dL)	79.3 (± 14.7)	105.6 (± 23.7)	0.011

Variables described as mean ± standard deviation or median (25th-75th percentile). * Student *t*-test or Mann-Whitney *U* test, *p* < 0.05 considered significant. Abbreviations: (ALT) alanine aminotransferase, (AST) aspartate aminotransferase, (LDL) low-density lipoprotein and (HDL) high-density lipoprotein.

Table 2: Liver concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in an experimental model of NAFLD

Variable #	Control (n=10)	Intervention (n=10)	<i>p</i> *
IL-1 β (pg/mg)	2186.0 (\pm 302.9)	2934.3 (\pm 456.0)	0.001
TNF- α (pg/mg)	9720.3 (\pm 3048.0)	13904.3 (\pm 3231.5)	0.008
IL-6 (pg/mg)	50378.5 (\pm 8347.8)	49175.3 (\pm 7329.2)	0.736
IL-10 (pg/mg)	7116.8 (\pm 1158.4)	5125.9 (\pm 781.0)	< 0.001
IL-1 β /IL-10 ratio	0.3 (\pm 0.1)	0.6 (\pm 0.1)	< 0.001
TNF- α / IL-10 ratio	1.4 (\pm 0.6)	2.8 (\pm 1.0)	0.001
IL-6/IL-10 ratio	7.2 (\pm 1.3)	9.7 (\pm 1.7)	0.002

Variables described as mean \pm standard deviation; * Student *t*-test, *p* < 0.05 considered significant. Abbreviations: (NAFLD) non-alcoholic fatty liver disease, (IL) interleukin and (TNF) tumor necrosis factor.

Table 3: Distribution of histopathological findings according to the SAF algorithm

Variable #	Control (n=10)	Intervention (n=10)	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
SAF algorithm			< 0.001
No NAFLD	10 (100)*	0 (0.0)	
NAFLD	0 (0.0)	6 (60)*	
NASH	0 (0.0)	4 (40)*	

Variables described as frequency (%). *Statistically significant association according to adjusted residual test at 5% significance. Abbreviations: (NAFLD) non-alcoholic fatty liver disease, (NASH) non-alcoholic steatohepatitis and (SAF) steatosis- activity-fibrosis.

7.2 Artigo II

Title: Gut dysbiosis is related to high cardiovascular risk in an experimental model of non-alcoholic fatty liver disease

List of abbreviations: AC: atherogenic coefficient, BMP: Brazilian Microbiome Project, Casp-1: caspase-1, CRI: Castelli's Risk Index, CVD: cardiovascular disease, H&E: hematoxylin and eosin, HDLc: high density lipoprotein- cholesterol, HFD: high-fat diet, HFCD: high-fat and choline-deficient, IL: interleukin, LDLc: low density lipoprotein-cholesterol, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, Myd-88: myeloid differentiation primary response-88, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, NASH: non-alcoholic steatohepatitis, NLRP-3: NOD-like receptor protein-3, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, PCoA: principal coordinates analysis, PPAR- α : peroxisome proliferator-activated receptor- α , SAF: steatosis-activity-fibrosis, SD: standard diet, TC: total cholesterol, TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TLRs: toll-like receptors, TNF- α : tumor necrosis factor- α .

Acknowledgments: We would like to thank the Research Incentive Fund – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – HCPA), and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for financial support.

Abstract

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a progressive liver disease and is considered a risk factor for cardiovascular disease (CVD). The role of the microbiota has been assessed under these clinical conditions. **Objective:** To assess the intestinal microbiota, NAFLD and CVD risk in an experimental nutritional

model. **Methods:** Sprague Dawley rats were randomized into two groups (n=10): standard diet (SD) and high-fat and choline-deficient diet (HFCD). They were fed ad libitum for 16 weeks and euthanized afterwards. The biological materials were used in the biochemical, inflammatory, histological and microbiota assessments. **Results:** This HFCD diet model was able to induce a significant increase in the delta Lee index, abdominal circumference and visceral fat, in addition to causing biochemical and histological alterations consistent with those observed for NAFLD in humans. The HFCD group had a significant increase in atherogenic indices, mediators and liver inflammatory receptors, in addition to reporting inflammation and systemic endothelial dysfunction, represented by interleucina-1 β , monocyte chemoattractant protein-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and plasminogen activator inhibitor-1, which are markers correlated with NAFLD severity and CVD risk. We observed a significant increase in miR-122 and miR-33a in the HFCD group, with the inverse observed for miR-145 and miR-126, related to NAFLD and CVD risk. The HFCD group showed a significant decrease in fecal bacterial diversity and lower relative abundance of the *Firmicutes* phylum, correlated with NAFLD severity. **Conclusion:** Animals from the HFCD group developed NAFLD with changes in metabolic profile, obesity, inflammation, fibrogenesis, endothelial dysfunction and increased risk of developing CVD. Therefore, this model can be used in the development of studies on cardioprotection in NAFLD.

Keywords: Animal model, Cardiovascular disease; Gut microbiota; Non-alcoholic fatty liver disease.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a progressive liver disease that can progress into cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and affect several extrahepatic organs including the heart and vascular system (1, 2). NAFLD is considered a liver manifestation of the metabolic syndrome and an independent risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD) (3-5).

In fact, CVD has been reported as the leading cause of death in patients with NAFLD, which reinforces the importance of studies that assess this connection (1). However, the putative pathophysiological mechanisms that connect NAFLD and CVD are complex and not completely explained, but gut dysbiosis, with consequent decrease in bacterial diversity, and the presence of inflamed fat tissues, are related to the production of atherogenic lipids and lipoproteins, pro-inflammatory factors, and vasoactive and thrombogenic molecules related to CVD (1, 2). Recently, paracrine signaling mechanisms mediated by microRNAs have also been connected to NAFLD and CVD (3, 6).

Considering the polymorphic character of metabolic syndrome, NAFLD and CVD, which involve factors related to lifestyle and genetic susceptibility, animal models can be very useful in assessing the pathophysiological mechanisms involved. Thus, the purpose of this study was to assess the relationship between gut microbiota, NAFLD and increased cardiovascular risk in a NAFLD experimental nutritional model that mimics the metabolic alterations found in humans.

Methods

Animals and Experimental model

Twenty adult male Sprague Dawley rats weighing 280 - 350 g were used. The animals were kept in groups inside two polypropylene boxes, kept in a controlled temperature environment ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and a 12-hour light/dark cycle. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (protocol GPPG-HCPA No. 17-0501 and 17-0531) in accordance with the legislation in force in Brazil (Law No. 11,794).

After acclimatization to the environment, the animals were randomized into two experimental groups according to their weight ($n=10$): a group that received high-fat and choline-deficient diet (HFCD) for NAFLD induction, consisting of 31.5% total fat, enriched with 54.0% trans fatty acids (Rhoister Ltda., Brazil), and a standard diet group (SD, Nuvilab CR-1, Quimtia S.A., Brazil). Both groups received water and food ad libitum during the experiment. All animals were euthanized after 16 weeks of experiment.

Blood collection and Euthanasia

After 16 weeks of the experiment and prior to euthanized, the animals were fasted for eight hours. The rats were anesthetized with isoflurane and euthanized by cardiac exsanguination. Blood samples were collected and centrifuged at 15,000 g for 10 minutes. The obtained serum was maintained at -80°C until the analyses were performed. After that, fragments of liver tissue were stored at -80°C or fixed in 10% formaldehyde for the analysis of inflammatory and histological mediators, respectively. The feces present in the intestine were collected aseptically and kept at -80°C until analysis of the gut microbiota.

Lipid Profile, Atherogenic Ratios, Inflammation and Endothelial Dysfunction

Serum levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDLc), high density lipoprotein-cholesterol (HDLc) and triglycerides were determined using Labmax 560. The atherogenic ratios, calculated from the results of the lipid profile have been used as a tool for the prediction of cardiovascular risk. The atherogenic ratios were calculated as follows: Castelli's Risk Index (CRI)-I = TC/HDL, CRI-II= LDL/HDL and atherogenic coefficient (AC) = (TC– HDL)/HDL (7).

To detect serum changes in the inflammation markers and endothelial dysfunction, we analyzed interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, using a Luminex platform multiplex test (Millipore, Germany), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in ng/mL. With the ELISA technique, the serum IL-1 β (Thermo Scientific, USA) and IL-10 (Invitrogen, USA), according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 450 nm (Zenyth 200 rt) and the results were expressed in pg/mL. All analyses were performed in duplicate.

Gene Expression of the Mediators and Receptors Inflammatory

The collected hepatic tissue was used to extract the RNA using the RNeasy mini kit (Qiagen, USA). The cDNA conversion, from 2 μ g of the extracted RNA, was performed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA). RT-qPCR with TaqMan probes (Applied Biosystems, USA) was used to assess the gene expression of *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Il18*, *Myd88*, *Tlr4*, *Tlr2*, *Tlr9*, *Ppara*, *Casp1*

and *Nlrp3*. The *Actb* gene was used as a normalizer. The probe identification is described in Supplementary Table 1. Values were calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analysis of the Circulating microRNAs

From the collected serum, total RNA extraction was performed using the miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, USA) to analyze the circulating microRNAs. Then, cel-miR-39 (1.6×10^8 copies) spike in control (Qiagen, USA) was added to provide an internal reference for normalization of technical variations between samples according to the manufacturer's instructions. cDNA conversion was performed from 10 ng of total RNA using the TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA), following the manufacturer's instructions. Analysis of the gene expression of miR-122, miR-33a, miR-126, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-499, miR-186 and miR-208b, together with the cell-miR-39 normalizer, was performed by RT-qPCR using TaqMan probes (Applied Biosystems, USA). The codes of the assessed microRNAs are described in Supplementary Table 1. Values were calculated by formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Amplification and Next-Generation Sequencing and bioinformatic analysis

The bacterial DNA was isolated from the fecal samples using the QIAamp fast DNA stool mini kit (Qiagen, USA), following the manufacturer's instructions. Was amplified by PCR the hypervariable V4 region from rRNA gene using the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). To pool different samples in the same reaction, we used the primer-fusion method and each sample had a distinct barcode attached on the corresponding PCR product. The purified products were subjected to emulsion

PCR using Ion PGM™ Hi-Q™ view OT2 kit (Thermo Fisher Scientific, USA). After, the resulting enriched beads were sequenced in an NGS machine (Ion Torrent PGM, Life Technologies) using Ion PGM™ Hi-Q™ view sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA). All raw data was exported as a unique FastQ file and submitted to Brazilian Microbiome Project (BMP) analysis pipeline encompass different scripts and software's such as QIIME and UPARSE to evaluate the 16S rRNA phylogenetic profiling (8). Briefly, OTU mapping was performed using the USEARCH quality filter pipeline 20, to remove putatively erroneous reads (chimeras). The most abundant sequence in each OTU were selected to assign a taxonomic classification based on the Green Genes database using the rdp classifier, clustering the sequences at 97% similarity with a 0.80 confidence threshold. QIIME was also used to calculate. The data was processed in the QIIME software and a SPF file was generated and assessed in STAMP software.

Histological Analysis

Formalin-fixed liver tissue samples were embedded in paraffin and subjected to hematoxylin and eosin (H&E) and picrosirius staining. Histopathological lesions were evaluated by steatosis-activity-fibrosis (SAF) score (9). The analysis was performed by an experienced pathologist, blinded to the experimental groups. Fibrosis was quantified by morphometric analysis after picrosirius staining. Ten randomly selected field images were obtained per animal, using the Olympus BX51 microscope, and the QCapture X64 program with 200X magnification was used for determination of staining intensity. This evaluation was performed using the ImageJ program (version 1.51p).

Statistical Analysis

The symmetry of the data was tested using the Shapiro-Wilk test. The Student's t, Mann-Whitney U test and Spearman correlation were performed. The levels of moderate ($0.3 < r < 0.6$), strong ($0.6 < r < 0.9$) or very strong ($0.9 < r < 1.0$) correlation were adopted. Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation or median and 25th - 75th percentiles. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. The data were analyzed in the Statistical Package for the Social Sciences 18.0 (SPSS Inc, USA).

Results

The animals in the HFCD group had a significant increase in the delta Lee index ($p = 0.017$), bigger abdominal circumference ($p < 0.001$) and visceral fat ($p < 0.001$) than the animals in the SD group, as well as significant elevation of serum levels of alanine aminotransferase ($p = 0.010$) and glycemia ($p = 0.013$). In addition, all animals in this group developed NAFLD (with or without non-alcoholic steatohepatitis, NASH) and showed a significant increase ($p < 0.001$) in collagen fibers deposition (Longo et al., submitted).

Lipid Profile, Atherogenic Indices, Inflammation and Endothelial Dysfunction to Assess Cardiovascular Risk

The results obtained for the parameters of the lipid profile and atherogenic indices are described in Table 1. We observed significant alterations in the serum levels of the lipid profile and atherogenic indices in the HFCD group in relation to the SD group. There was a significant increase in the serum concentration of IL-1 β ($p = 0.001$), MCP-1 ($p = 0.004$), TIMP-1 ($p < 0.001$) and PAI-1 ($p = 0.019$) in the HFCD group when

compared to the SD group (Fig. 1A-D). Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α were not analyzed as the results were below the detection limit of the test.

Expression of Genes Involved in NAFLD Pathogenesis

The results obtained from the gene expression of the inflammatory mediators and receptors related to the pathogenesis of NAFLD are reported in Table 2. There was a significant increase in the gene expression in the liver tissue of *Tlr4* and *Tlr9* in the HFCD group compared to the SD group. We found no significant difference between the groups for *Tlr2*. There was a significant increase in the expression of *Myd88*, *Nlrp3*, *Casp1*, *Tnfa*, *Il6* and *Il18* in the HFCD group when compared to the SD group. We found no significant difference between the groups in the expression of *Il1b* and *Il10*. The HFCD group showed a significant decrease in the gene expression of *Ppara* in relation to the SD group.

Gene Expression of the Circulating microRNAs

The results obtained from the gene expression of the circulating microRNAs are described in Table 3. There was a significant increase in the gene expression of miR-122 and miR-33a in the HFCD group compared to the SD group. We observed a significant decrease in the expression of miR-145 and miR-126 in the HFCD group. There was no difference between groups in the expression of miR-499, miR-186, miR-143 and miR-146a. The circulating miR-208b did not amplified.

Composition of the Fecal Microbiota

The analysis revealed a highly diversified microbiota in a total of 10,000 unique readings. The alpha diversity rarefaction curves of the species reached a saturation

phase of approximately 144 and 257 OTUs for the HFCD and SD group, respectively, indicating that adequate coverage of the sequence was obtained to reliably describe bacterial diversity (Fig. 2A). At the bacterial branch distance, we demonstrated a significantly lower alpha diversity in the HFCD group compared to the SD group ($p = 0.045$).

In order to assess relationships among samples based on differences in phylogenetic diversity, three-dimensional principal coordinate analysis (PCoA) plots were analyzed from weighted UniFrac (Fig. 2B) distances, for the evaluation of the community composition metrics were used for the estimation of the dissimilarity among samples. In the PCoA graph there is a clear separation of the bacterial communities between the HFCD and SD groups. In general, bacterial communities in both groups were dominated by phyla *Bacteroidetes* (54.4%) and *Firmicutes* (43.4%). In a small proportion, in both groups, the phyla *Proteobacteria* (1.1%), *Verrucomicrobia* (0.7%), *Cyanobacteria* (0.2%) and *Tenericutes* (0.1%) were identified. The distinguishable separation of the bacterial communities found in PCoA was accompanied by differences in the composition of the fecal microbiota. There was a greater relative abundance of *Bacteroidetes* in the HFCD group, but there was no significant difference compared to the SD group ($p = 0.077$) (Fig. 2C). There was a significant decrease ($p = 0.047$) in the relative abundance of the *Firmicutes* phylum (Fig. 2C) in the HFCD group. We did not observe a significant difference between groups for *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio ($p = 0.077$). At the class level, we observed a dominance of *Bacteroidia* (54.4%) and *Clostridia* (40.5%) in both groups (Fig. 2D). Among the *Firmicutes* phylum, we found a lower ($p = 0.040$) and higher ($p < 0.001$) relative abundance of the *Clostridia* and *Erysipelotrichi* class, respectively in the HFCD

group compared to the SD group. At the family level, we observed a significant increase in the relative abundance of *Ruminococcaceae* ($p = 0.040$), belonging to the *Clostridia* class in the HFCD group.

Correlations Between the NAFLD, Risk Factor for CVD and Gut Microbiota

The values obtained from the correlation between NAFLD, CVD risk factors and microbiota composition are described in Table 4. For this analysis we selected SAF, TIMP-1 and miR-145 scores as markers of severity and progression of NAFLD. For assessing the inflammatory response triggered by NAFLD, we selected the NOD-like receptor protein (NLRP)-3, myeloid differentiation primary response (Myd)-88, MCP-1, IL-1 β and IL-18. For the analysis of CVD risk factors and metabolism of lipids, we selected miR-33a, miR-126, PAI-1, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α , CRI-I and CRI-II. For the analysis of the fecal microbiota we selected the *Firmicutes* phylum.

Discussion

This experimental model was able to induce biochemical, inflammatory and histological alterations, corresponding to those observed in NAFLD in humans and can be used to assess the relationship between the disease and the risk of CVD and gut microbiota. In fact, in this study the animals of the HFCD group developed NAFLD, with inflammation and systemic endothelial dysfunction, increasing the risk of developing CVD, as demonstrated by the markers. In addition, a significant decrease in fecal bacterial diversity and in the relative abundance of the *Firmicutes* phylum was observed.

Among the risk factors associated with the development of CVD in NAFLD, the presence of dyslipidemia is an important predictor (3, 10). In this study, we observed that the HFCD group presented significant alterations in the lipid profile and in the atherogenic indices analyzed, when compared to the SD group. Studies corroborate our data and report that more atherogenic lipid rates correlate significantly with NAFLD severity (3, 11).

The liver is an important and sometimes exclusive source in the synthesis of pro and anticoagulant factors, so changes in the production of these factors may in part explain the prothrombotic state in obesity and the correlation of NAFLD with increased risk of CVD (3, 12). PAI-1 plays a key role in fibrinolysis, coagulation, inflammation and fibrogenesis (12, 13). In this study, we observed a significant increase in the serum levels of PAI-1, TIMP-1 and MCP-1 in the HFCD group, with a positive correlation for histological lesion severity. Corroborating with our data, Jin et al. correlate the increase in plasma levels of PAI-1 with the histological severity of NAFLD and alterations in the lipid profile, promoting a more atherogenic phenotype (13). PAI-1 also plays a vital role in hepatic fibrosis through matrix metalloproteinases, promoting the increase of extracellular matrix deposition in the hepatic tissue and initiating the fibrogenesis process, in which TIMP-1 performs a similar function (12).

The translocation of bacteria and bacterial byproducts occurs in gut dysbiosis, stimulating liver cells to trigger an immune response (14-16). In this study, we observed a significant increase in toll-like receptors (TLR)-4 and TLR-9 in the HFCD group, which activated Myd-88, triggering an inflammatory response, by inducing the expression of inflammatory cytokines and chemokine. In parallel, activation of the NLRP-3 complex occurred in the HFCD group, correlating with some inflammatory markers and hepatic

fibrogenesis. Corroborating with our data, Sui et al. reported that hepatic steatosis induced by high-fat diet (HFD) in mice directly stimulated the TLRs to activate the NLRP3 complex, triggering an inflammatory response with worsening liver lesions (16). However, the contribution of NLRP3 activation in the development of NAFLD remains uncertain. Inhibition of one of the components of this pathway has been shown to protect animals against insulin resistance and NASH and may be a therapeutic target (17, 18). Another study demonstrated that knockouts of NLRP3 inflammasome components and associated proteins show a modest increase in steatosis and inflammation in the liver. Interestingly, this phenotype was transmissible to wildtype mice co-housed with knockouts, suggesting that NLRP3 inflammasome deficiency may result in an altered communicable gut microbiota that, in turn, may drive the early changes associated with NAFLD (19). Activation of NLRP3 is also related to the onset of CVD (20, 21). In our study, we observed that NLRP3 expression correlates positively with PAI-1 and CRI-II, both markers of CVD risk. The accumulation of fats and the inflammatory infiltration present in the atherosclerotic plaques, activate NLRP3, aggravating the lesion (20, 21). In an experimental model of atherosclerosis, it was demonstrated that mice deficient in NLRP3, showed protection against the development of the disease (21).

A healthy liver does not accumulate fat and PPAR- α is involved in several aspects of its metabolism, including fatty acid degradation, synthesis, transport, storage and metabolism of lipoproteins (5, 22, 23). In this study, there was a significant decrease in PPAR- α in the HFCD group, in addition to a negative correlation with histological lesion severity and atherogenic markers. Preclinical and clinical studies emphasize that PPAR- α influences the development and progression of NAFLD and CVD,

corroborating our data (4, 5, 22, 23). In patients with atherogenic dyslipidemia, synthetic PPAR- α agonists are useful in the treatment of NAFLD and its complications, such as CVD (5).

Assessment of microRNAs is being used for early-detection of diseases or to monitor their progression (24). In this study we observed a significant increase of miR-122 and miR-33a in the HFCD group in relation to the SD group. The reverse was observed for miR-145 and miR-126. Pirola et al. demonstrated that, among 84 analyzed microRNAs, the expression of miR-122, miR-192, miR-125b and miR-375 was positively regulated in NASH patients, however, only miR-122 was associated with histological progression of the disease, which does not corroborate with our data, since we did not observe a correlation between miR-122 expression and lesion severity (24). The miR-145 plays a role in limiting the development of liver fibrosis by markedly blocking the activation and proliferation of hepatic stellate cells (25). In this study, there was an inverse correlation between miR-145 and serum levels of TIMP-1 and SAF score. Consistent with our results, the expression of miR-145 in liver tissue in an experimental model of liver fibrosis negatively regulated fibrogenesis and favored apoptosis (25). The miR-33a inhibits genes involved in HDL synthesis and the reverse transport of cholesterol (6, 26). Thus, miR-33a expression correlates negatively with HDL serum levels and positively with liver injury severity and atherogenic indices. Silencing miR-33 is a therapeutic strategy in the prevention of CVD (6). However, it has been reported that prolonged silencing of miR-33 in an experimental model of HFD caused hepatic steatosis and hypertriglyceridemia (27). The miR-126 is highly expressed by endothelial cells and regulates the migration of inflammatory cells, formation of the capillary network and cell survival (28). In this study, there was an

inverse correlation between miR-126 and atherogenic indices, endothelial dysfunction, inflammatory and fibrogenesis markers, and severity of liver injury. Harris et al. demonstrated that blocking miR-126 expression triggers an inflammatory response and increases the adhesion of leukocytes to endothelial cells, an important process in the development of atherosclerosis (29).

It is believed that gut dysbiosis is directly associated with the development and progression of NAFLD and cardiovascular outcomes. In our study, we reported a significant decrease in fecal bacterial diversity, but we did not observe a significant difference in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. There was a significant decrease in the relative abundance of the *Firmicutes* phylum in the HFCD group, correlating inversely with the presence of inflammation and severity of the histological lesion. The human and rodent gut microbiota is dominated by bacteria belonging to *Firmicutes* and *Bacteroidetes*; however, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* and *Cyanobacteria* are present in lower proportions (30). Although the characterization of a "healthy" microbiota is in its early stages, evidence associates a change in the ratio between the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla and a decrease in bacterial diversity with the development of obesity and CVD (30, 31). In agreement with our data, studies report that in gut dysbiosis there is a reduction in the relative abundance of autochthonous bacteria of the *Firmicutes* phylum and an increase in *Bacteroidetes* (32, 33), but the reverse has also been reported (34, 35). Bacteria from the *Firmicutes* phylum are essential for synthesizing short-chain fatty acids. When they are reduced, there are changes in the permeability of the gut barrier, associated with liver inflammation and endotoxemia (32). The typical Western diet, in addition to being high in fat, provides low fiber intake, reducing the synthesis of short-chain fatty acids and

contributing to the progression of NAFLD (32). Currently it is difficult to identify which microbiota differences are causal and which are coincidental in the development of NAFLD. Currently it is difficult to identify which microbiota differences are causal and which are coincidental in the development of NAFLD. Although there have been several findings on the composition of the gut microbiota, its causal part in the development of chronic diseases remains limited. The identification of gut microbial metabolites has been considered more important than describing the microbial composition, since it enables a detailed description of its functional properties (36).

In summary, our data found that HFCD animals developed NAFLD with changes in metabolic profile, obesity, inflammation, fibrogenesis, endothelial dysfunction and a higher risk of developing CVD than the animals in the SD group. In addition, there was a decrease in the fecal bacterial diversity in this group, which is related to gut dysbiosis, and could explain our findings, at least in part. The use of this model may contribute to the development of studies aimed at cardioprotection in NAFLD, an outcome that is not usually assessed in clinical trials. Subsequent studies assessing metabolomic approaches may aid in elucidating gut microbial function with the development of metabolic disorders related to NAFLD.

References

1. Anstee QM, Mantovani A, Tilg H, Targher G. Risk of cardiomyopathy and cardiac arrhythmias in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 15 (7): 425-39.
2. Mantovani A, Ballestri S, Lonardo A, Targher G. Cardiovascular Disease and Myocardial Abnormalities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2016; 61 (5): 1246-67.
3. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. 2016; 65 (2): 425-43.
4. Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015; 63 (1): 164-73.
5. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016; 150 (5): 1147-59 e5.
6. Willeit P, Skroblin P, Kiechl S, Fernández-Hernando C, Mayr M. Liver microRNAs: potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease? *Eur Heart J*. 2016; 37 (43): 3260-6.
7. Sujatha R, Kavitha S. Atherogenic indices in stroke patients: A retrospective study. *Iran J Neurol*. 2017;16(2):78-82.
8. Pylro VS, Roesch LF, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014; 107: 30-7.
9. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012; 56 (5): 1751-9.

10. Kim EJ, Kim BH, Seo HS, Lee YJ, Kim HH, Son HH, et al. Cholesterol-induced non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis aggravated by systemic inflammation. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e97841.
11. Nobili V, Alkhoury N, Bartuli A, Manco M, Lopez R, Alisi A, et al. Severity of liver injury and atherogenic lipid profile in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res*. 2010; 67 (6): 665-70.
12. Barrera F, George J. Prothrombotic factors and nonalcoholic fatty liver disease: an additional link to cardiovascular risk? *Hepatology*. 2014; 59 (1): 16-8.
13. Jin R, Krasinskas A, Le NA, Konomi JV, Holzberg J, Romero R, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 and severity of liver injury and cardiovascular risk in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatr Obes*. 2018; 13 (1): 23-9.
14. Mridha AR, Haczeyni F, Yeh MM, Haigh WG, Ioannou GN, Barn V, et al. TLR9 is up-regulated in human and murine NASH: pivotal role in inflammatory recruitment and cell survival. *Clin Sci (Lond)*. 2017; 131 (16): 2145-59.
15. Liu J, Zhuang ZJ, Bian DX, Ma XJ, Xun YH, Yang WJ, et al. Toll-like receptor-4 signalling in the progression of non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat and high-fructose diet in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014; 41 (7): 482-8.
16. Sui YH, Luo WJ, Xu QY, Hua J. Dietary saturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid oppositely affect hepatic NOD-like receptor protein 3 inflammasome through regulating nuclear factor-kappa B activation. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (8): 2533-44.
17. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*. 2014; 92 (10): 1069-82.
18. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011;12 (5): 408-15.

19. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012; 482 (7384): 179-85.
20. Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev*. 2015; 265 (1): 53-62.
21. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010; 464 (7293): 1357-61.
22. Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut*. 2016; 65 (7): 1202-14.
23. Jain MR, Giri SR, Bhoi B, Trivedi C, Rath A, Rathod R, et al. Dual PPAR α / γ agonist saroglitazar improves liver histopathology and biochemistry in experimental NASH models. *Liver Int*. 2018; 38 (6): 1084-94.
24. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut*. 2015; 64 (5): 800-12.
25. Yang J, Liu Q, Cao S, Xu T, Li X, Zhou D, et al. MicroRNA-145 Increases the Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells Induced by TRAIL through NF- κ B Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 980.
26. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, et al. MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. *Nat Commun*. 2013; 4: 2883.
27. Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, Guo L, Allen RM, Yin X, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. *EMBO Mol Med*. 2014; 6 (9): 1133-41.

28. Rawal S, Munasinghe PE, Shindikar A, Paulin J, Cameron V, Manning P, et al. Down-regulation of proangiogenic microRNA-126 and microRNA-132 are early modulators of diabetic cardiac microangiopathy. *Cardiovasc Res.* 2017; 113 (1): 90-101.
29. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105 (5): 1516-21.
30. Sanduzzi Zamparelli M, Compare D, Coccoli P, Rocco A, Nardone OM, Marrone G, et al. The Metabolic Role of Gut Microbiota in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (8).
31. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension.* 2015; 65 (6): 1331-40.
32. Acharya C, Bajaj JS. Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017; 46 (1): 155-69.
33. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013; 57 (2): 601-9.
34. Ishioka M, Miura K, Minami S, Shimura Y, Ohnishi H. Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models. *Dig Dis Sci.* 2017; 62 (2): 396-406.
35. Liu JP, Zou WL, Chen SJ, Wei HY, Yin YN, Zou YY, et al. Effects of different diets on intestinal microbiota and nonalcoholic fatty liver disease development. *World J Gastroenterol.* 2016; 22 (32): 7353-64.
36. Martinez KB, Leone V, Chang EB. Microbial metabolites in health and disease: Navigating the unknown in search of function. *J Biol Chem.* 2017; 292 (21): 8553-9.

Figure Legends

Figure 1: serum concentrations of the inflammatory and endothelial dysfunction markers. (A) IL-1 β ($p = 0.001$), (B) MCP-1 ($p = 0.004$), (C) TIMP-1 ($p < 0.001$), (D) PAI-1 ($p = 0.019$). Data expressed as mean \pm standard deviation, Student's t-test. * significant difference observed between groups. Abbreviations: HFCD: high-fat and choline-deficient, IL: interleukin, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, SD: standard diet, TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

Figure 2: Fecal microbiota analysis. (A) Alpha rarefaction plot of observed species, (B) Principal coordinates analysis (PCoA) plots using weighted UniFrac distances, (C) Relative abundance of readings assigned to *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phylum, (D) Stacked bar chart representing the relative abundance of bacterial phylum and classes. $p \leq 0.05$ were considered significant. * significant difference observed between groups.

Figure 1: A and D

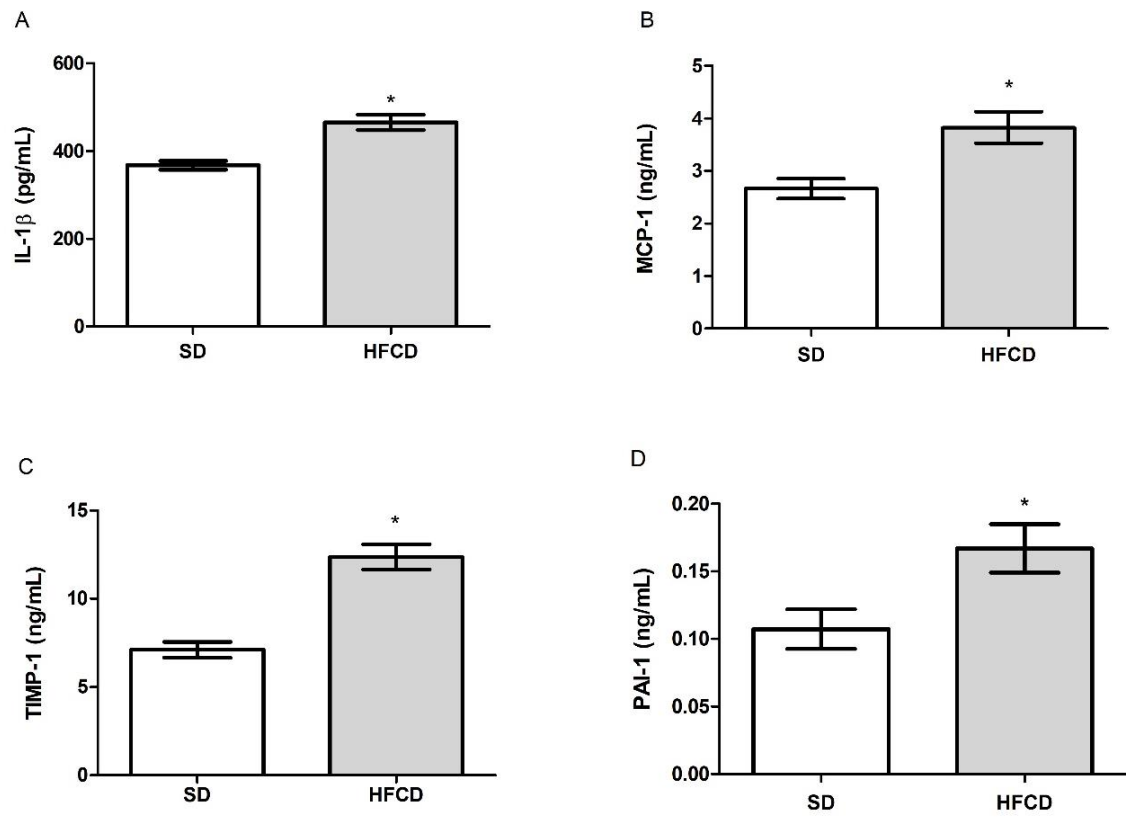


Figure 2: A and D

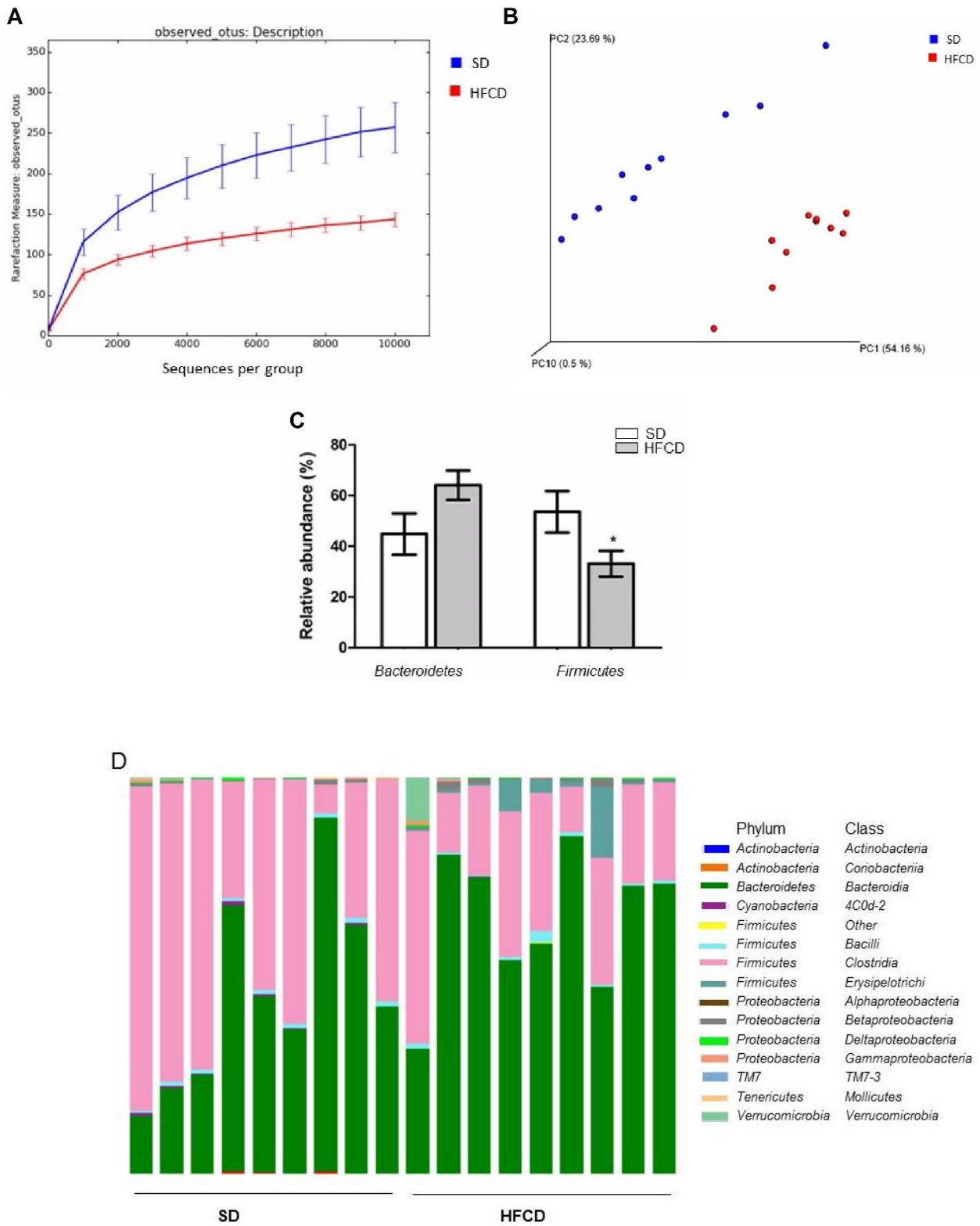


Table 1. Lipid profile and atherogenic indices

Variables #	SD (n=10)	HFCD (n=10)	<i>p</i> *
TC (mg/dL)	78.7 (± 11.7)	101.8 (± 27.5)	0.033
LDL – cholesterol (mg/dL)	16.7 (± 2.7)	23.4 (± 6.6)	0.011
HDL – cholesterol (mg/dL)	62.7 (± 31.3)	31.3 (± 6.6)	0.006
Triglycerides (mg/dL)	79.3 (± 14.7)	105.6 (± 23.7)	0.011
AC	0.6 (0.2 – 0.9)	2.5 (1.5 – 3.4)	< 0.001
CRI-I	1.6 (± 0.4)	3.5 (± 1.1)	< 0.001
CRI-II	0.3 (± 0.1)	0.8 (± 0.2)	< 0.001

Variables described as mean ± standard deviation or median (25th - 75th percentiles) **p* ≤ 0.05 was considered as statistically significant. Abbreviations: AC: atherogenic coefficient, CRI: Castelli Risk Index, HDL: high density lipoprotein; HFCD: high-fat and choline-deficient, LDL: low density lipoprotein, SD: standard diet, TC: total cholesterol.

Table 2. Expression of genes involved in NAFLD pathogenesis

Variables #	SD (n=10)	HFCD (n=10)	<i>p</i> *
<i>Tlr4</i>	17.3 (0.2 – 9.0)	50.5 (2.2 – 40.7)	0.041
<i>Tlr9</i>	0.3 (0.3 – 0.5)	3.2 (0.3 – 3.8)	0.033
<i>Tlr2</i>	1.3 (0.5 – 2.0)	1.0 (0.1 – 1.8)	0.364
<i>Myd88</i>	1.6 (0.4 – 2.4)	5.1 (2.9 – 7.7)	0.001
<i>Nlrp3</i>	3.9 (1.4 – 4.2)	13.8 (3.8 – 20.5)	0.019
<i>Casp1</i>	2.1 (0.2 – 3.1)	82.3 (10.1 – 148.0)	< 0.001
<i>Tnfa</i>	17.3 (0.3 – 1.6)	111.4 (1.0 – 193.2)	0.028
<i>Il6</i>	1.2 (0.6 – 1.7)	9.8 (1.3 – 6.2)	0.013
<i>Il18</i>	2.2 (0.4 – 3.2)	14.9 (2.0 – 25.0)	0.007
<i>Il1b</i>	1.2 (0.7 – 1.7)	2.5 (1.1 – 3.9)	0.082
<i>Il10</i>	1.3 (0.6 – 1.7)	1.4 (0.6 - 2.1)	0.940
<i>Ppara</i>	1.4 (0.5 – 2.2)	0.4 (0.1 – 0.4)	0.008

Variables described as median (25th - 75th percentiles) **p* ≤ 0.05 was considered as statistically significant. Abbreviations: Casp-1: caspase-1, HFCD: high-fat and choline-deficient, IL: interleukin, MyD-88: myeloid differentiation primary response-88, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, NLRP-3: Nod-like receptor protein-3, PPAR: peroxisome proliferator activated receptor, SD: standard diet, TLR: toll-like receptor, TNF: tumor necrosis factor.

Table 3. Assessment of the gene expression of circulating microRNAs

Variables #	SD (n=10)	HFCD (n=10)	<i>p</i> *
miR-122	1.4 (0.4 – 2.2)	5.6 (1.3 – 10.1)	0.041
miR-33a	2.6 (0.3 - 4.0)	47.9 (6.0 – 71.8)	0.001
miR-145	1.5 (0.5 – 1.9)	0.4 (0.1 – 0.5)	0.010
miR-126	1.1 (0.7 - 1.2)	0.3 (0.1 - 0.5)	< 0.001
miR-499	1.4 (0.5 – 2.3)	0.7 (0.3 – 1.0)	0.171
miR-186	1.1 (0.7 – 1.4)	0.8 (0.2 – 1.2)	0.151
miR-143	2.0 (0.4 – 4.5)	0.8 (0.2 - 1.3)	0.199
miR-146a	1.8 (0.4 – 3.3)	2.8 (1.2 – 4.7)	0.151

Variables described as median (25th - 75th percentiles) **p* ≤ 0.05 was considered as statistically significant. Abbreviations: HFCD: high-fat and choline-deficient and SD: standard diet.

Table 4. Correlations Between the NAFLD, Risk Factor for CVD and Gut Microbiota

Variables #	TIMP-1	miR-145	NLRP3	Myd-88	MCP-1	IL-1 β	IL-18	miR-33a	miR-126	PAI-1	PPAR- α	CRI-I	CRI-II	<i>Firmicutes</i>
SAF	0.810*	- 0.642*	0.439	0.621*	0.624*	0.724*	0.546*	0.603*	- 0.814*	0.529*	- 0.639*	0.792*	0.835*	- 0.516*
TIMP-1	-	- 0.522*	0.492*	0.614*	0.803*	0.726*	0.451*	0.728*	- 0.812*	0.535*	- 0.549*	0.691*	0.747*	- 0.613*
miR-145		-	- 0.298	- 0.498*	- 0.507*	- 0.361	- 0.468*	- 0.302	0.519*	- 0.288	0.472*	- 0.393	- 0.530*	0.444
NLRP3			-	0.779*	0.215	0.535*	0.824*	0.523*	- 0.552*	0.582*	- 0.499*	0.302	0.498*	- 0.040
Myd-88				-	0.287	0.619*	0.884*	0.682*	- 0.738*	0.564*	- 0.663*	0.567*	0.663*	- 0.139
MCP-1					-	0.567*	0.120	0.492*	- 0.623*	0.336	- 0.209	0.549*	0.561*	- 0.729*
IL-1 β						-	0.604*	0.809*	- 0.668*	0.544*	- 0.546*	0.645*	0.688*	- 0.293
IL-18							-	0.476*	- 0.608*	0.520*	- 0.573*	0.444	0.546*	- 0.072
miR-33a								-	- 0.655*	0.363	- 0.610*	0.529*	0.603*	- 0.230
miR-126									-	- 0.634*	0.442	- 0.712*	- 0.730*	0.508*
PAI-1										-	- 0.531*	0.487*	0.671*	- 0.032
PPAR- α											-	- 0.523*	- 0.688*	0.152
CRI-I												-	0.863*	- 0.358
CRI-II													-	- 0.351

Variables was represented for r the Pearson's * $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant. Moderate ($0.3 < r < 0.6$), strong ($0.6 < r < 0.9$) or very strong ($0.9 < r < 1.0$) correlation of Pearson's r. Abbreviation: CRI: Castelli's Risk Index, CVD: cardiovascular disease, IL: interleukin, MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, Myd-88: myeloid differentiation primary response-88, NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease, NLRP3: nod-like receptor protein-3, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1, PPAR- α : peroxisome proliferator-activated receptor- α , SAF: steatosis-activity-fibrosis, TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

Supplementary Table 1: Probes identification

Assay Name	Assay ID	Catalogue number (Life Technologies Ltd)
rno-miR-122-5p	002245	4427975
hsa-miR-33a-5p	002135	4427975
hsa-miR-126-3p	002228	4427975
mmu-miR-143-5p	463509_mat	4427975
hsa-miR-145-5p	002278	4427975
hsa-miR-146a-5p	000468	4427975
mmu-miR-499-5p	001352	4427975
hsa-miR-186-5p	002285	4427975
rno-miR-208b-5p	461846_mat	4440885
cel-miR-39-3p	000200	4427975
<i>Il6</i>	Rn01410330_m1*	4331182
<i>Il10</i>	Rn00563409_m1*	4331182
<i>Tnfa</i>	Rn00562055_m1	4331182
<i>Il18</i>	Rn01422083_m1	4448892
<i>Il1b</i>	Rn00580432_m1	4453320
<i>Myd88</i>	Rn01640049_m1	4331182
<i>Tlr4</i>	Rn00569848_m1*	4331182
<i>Tlr2</i>	Rn02133647_s1	4453320
<i>Tlr9</i>	Rn01640054_m1	4448892
<i>Ppara</i>	Rn00566193_m1	4453320
<i>Casp1</i>	Rn00562724_m1	4453320
<i>Nlrp3</i>	Rn04244620_m1	4448892
<i>Actb</i>	Rn00667869_m1	4448484

8. CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos em relação à avaliação da composição da microbiota intestinal e sua relação com o aumento do RCV em um modelo experimental de DHGNA, induzida por DHDC em ratos, os resultados obtidos nos estudos realizados para esta tese (n° GPPG/ HCPA 17-0021, 17-0621, 17-0501 e 17-0531) nos permitem concluir, respondendo aos objetivos específicos:

1. Desenvolvemos um modelo experimental nutricional híbrido de DHGNA, a partir da associação da DDC e dieta rica em gordura, fornecida aos animais por 16 semanas *ad libitum*. O modelo de DDC, promove o acúmulo de TGs no tecido hepático, pelo fato destes não conseguirem se acoplar as partículas de VLDL para serem exportados e armazenados nos adipócitos. Vale ressaltar, que a deficiência em colina pode ocorrer sob condições fisiopatológicas, principalmente quando associado a dieta rica em gordura, acentuando o acúmulo de TGs nos hepatócitos. Nos animais com DHGNA, observamos um aumento significativo no delta de índice de Lee, circunferência abdominal, acúmulo de tecido adiposo abdominal, peso do fígado fresco e relação peso fígado / peso corpóreo em comparação ao grupo controle.
2. Nos animais com DHGNA, houve aumento significativo nos níveis séricos de ALT, glicose, colesterol total, LDL e triglicerídeos, além da diminuição dos níveis de HDL em relação ao grupo controle. Não observamos diferença significativa entre os grupos nos níveis séricos de AST e albumina.
3. Houve aumento significativo na concentração hepática das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α no grupo intervenção. Não observamos

diferença significativa entre os grupos na concentração de IL-6. Relatamos diminuição significativa no grupo intervenção na concentração da citocina anti-inflamatória IL-10. Houve aumento significativo no grupo intervenção nos índices inflamatórios, IL-1 β /IL-10, TNF- α /IL-10 e IL-6/IL-10, em relação ao grupo controle.

4. Todos os animais do grupo intervenção desenvolveram DHGNA, com ou sem a presença de esteato-hepatite, enquanto no grupo controle não houve qualquer alteração histológica. Nos animais com DHGNA, relatamos um aumento significativo na deposição das fibras de colágeno no tecido hepático em relação ao grupo controle.
5. Houve aumento significativo no grupo intervenção dos seguintes índices aterogênicos: coeficiente aterogênico, índice de risco Castelli-I e índice de risco Castelli-II em relação ao grupo controle. Observamos aumento significativo no grupo intervenção na concentração sérica de IL-1 β , MCP-1, TIMP-1 e PAI-1, marcadores de inflamação e disfunção endotelial. Os dados obtidos para as dosagens de TNF- α , IL-6 e IL-10, não foram analisados, pois os resultados ficaram a baixo do limite de detecção do teste.
6. Houve aumento significativo no grupo intervenção na expressão gênica no tecido hepático de TLR-4, TLR-9, MyD-88, TNF- α , IL-6, IL18, NLRP-3 e caspase-1, além da diminuição significativa na expressão de PPAR- α em relação ao grupo controle. Não observamos diferença significativa entre os grupos na expressão gênica de TLR-2, IL-1 β e IL-10.
7. Houve aumento significativo nos animais com DHGNA na expressão gênica dos microRNAs circulantes miR-33a e miR-122, o inverso foi observado para

a expressão de miR-145 e miR-126, em relação ao grupo controle. Não observamos diferença significativa entre os grupos na expressão gênica dos microRNAs circulantes miR-186, miR-499, miR-146a e miR-143. O gene miR-208b não amplificou em ambos os grupos.

8. Observamos uma diminuição significativa na diversidade bacteriana, nos animais do grupo intervenção em relação ao grupo controle. Na composição da microbiota fecal, houve dominância na abundância relativa dos filos *Bacteroidetes* (54,4%) e *Firmicutes* (43,4%), em ambos os grupos. Os animais com DHGNA apresentaram diminuição significativa na abundância relativa do filo *Firmicutes*, em relação ao grupo controle. A nível de classe, relatamos uma diminuição significativa na abundância relativa de *Erysipelotrichi* nos animais do grupo intervenção, o inverso foi relatado para a classe *Clostridia*.

Em resumo, nossos dados demonstram que o modelo nutricional de DHDC é de fácil estabelecimento e execução, e parece conseguir mimetizar as alterações da DHGNA em humanos, o que é muito significativo quando avaliamos os modelos experimentais disponíveis na literatura. Observamos um maior risco de desenvolvimento de DCV nos animais com DHGNA, e isso foi relacionado à disbiose da microbiota fecal. A utilização deste modelo experimental pode vir a contribuir no desenvolvimento de estudos adicionais voltados para o diagnóstico a nível molecular, cardioproteção e identificação de possíveis alvos terapêuticos na DHGNA.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta tese não se esgota aqui. De fato, no momento, já estamos executando a avaliação de marcadores relacionados a permeabilidade intestinal, através da expressão gênica de claudina-1, claudina-2, claudina-4, ocludina, zona ocludente-1 e molécula de adesão juncional-1 (JAM-1, do inglês *junctional adhesion molecule-1*), no tecido delgado dos animais em estudo. A análise da integridade intestinal está sendo realizada, em lâminas de H&E, por uma patologista experiente e cegada em relação aos grupos experimentais. Após a obtenção dos resultados, iremos correlacionar os dados com os marcadores inflamatórios e de gravidade da DHGNA, RCV e microbiota fecal. Adicionalmente, estamos realizando avaliações histológicas do tecido cardíaco destes animais, através do programa Image-Pro Plus 6.0, para a análise do formato das fibras, presença de inflamação e espessamento da íntima-média. Além disso, iremos realizar a análise da expressão gênica de miR-186, miR-208b, miR-499, miR-146a, miR-33a, miR-122, miR-126, miR-143 e miR-145, no tecido cardíaco e hepático e assim correlacionar com os dados previamente obtidos para os microRNAs circulantes, marcadores da DHGNA, RCV e microbiota fecal. Futuramente, pretendemos utilizar este modelo experimental para a realização de estudos terapêuticos pré-clínicos relacionados especificamente à cardioproteção na DHGNA.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Than NN, Newsome PN. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*. 2015; 239 (1): 192-202.
2. Arab JP, Arrese M, Trauner M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Pathol*. 2018; 13: 321-50.
3. Jahn D, Kircher S, Hermanns HM, Geier A. Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochim Biophys Acta*. 2018.
4. Pardhe BD, Shakya S, Bhetwal A, Mathias J, Khanal PR, Pandit R, et al. Metabolic syndrome and biochemical changes among non-alcoholic fatty liver disease patients attending a tertiary care hospital of Nepal. *BMC Gastroenterol*. 2018; 18 (1): 109.
5. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013; 28 Suppl 1:68-76.
6. Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol*. 2018; 9:61.
7. Azzam H, Malnick S. Non-alcoholic fatty liver disease - the heart of the matter. *World J Hepatol*. 2015; 7 (10): 1369-76.
8. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. 2016; 65 (2): 425-43.
9. Aron-Wisnewsky J, Gaborit B, Dutour A, Clement K. Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19 (4): 338-48.

10. Rak K, Rader DJ. Cardiovascular disease: the diet-microbe morbid union. *Nature*. 2011; 472 (7341): 40-1.
11. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*. 2018.
12. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018; 67 (1): 123-33.
13. Willebrords J, Pereira IV, Maes M, Crespo Yanguas S, Colle I, Van Den Bossche B, et al. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res*. 2015; 59: 106-25.
14. Masarone M, Federico A, Abenavoli L, Loguercio C, Persico M. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Rev Recent Clin Trials*. 2014; 9 (3): 126-33.
15. Bieghs V, Trautwein C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2014; 3 (6): 377-85.
16. Meli R, Mattace Raso G, Calignano A. Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Front Immunol*. 2014; 5: 177.
17. Kikuchi L, Oliveira CP, Alvares-da-Silva MR, Tani CM, Diniz MA, Stefano JT, et al. Hepatocellular Carcinoma Management in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients: Applicability of the BCLC Staging System. *Am J Clin Oncol*. 2016; 39 (5): 428-32.

18. Cotrim HP, Oliveira CP, Coelho HS, Alvares-da-Silva MR, Nabuco L, Parise ER, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: Brazilian survey. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016; 71 (5): 281-4.
19. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut-Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)*. 2017; 4 (8).
20. Chao CY, Battat R, Al Khoury A, Restellini S, Sebastiani G, Bessissow T. Co-existence of non-alcoholic fatty liver disease and inflammatory bowel disease: A review article. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (34): 7727-34.
21. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010; 16 (42): 5286-96.
22. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64 (1): 73-84.
23. Goulart AC, Oliveira IR, Alencar AP, Santos MS, Santos IS, Martines BM, et al. Diagnostic accuracy of a noninvasive hepatic ultrasound score for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Sao Paulo Med J*. 2015; 133 (2): 115-24.
24. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015; 148 (3): 547-55.
25. Cholanckeril G, Wong RJ, Hu M, Perumpail RB, Yoo ER, Puri P, et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the US: Temporal Trends and Outcomes. *Dig Dis Sci*. 2017; 62 (10): 2915-22.

26. Younossi Z, Stepanova M, Ong JP, Jacobson IM, Bugianesi E, Duseja A, et al. Non-alcoholic Steatohepatitis is the Fastest Growing Cause of Hepatocellular Carcinoma in Liver Transplant Candidates. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018; pii: S1542-3565 (18) 30611-6.
27. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients*. 2017; 9 (10).
28. Lau JK, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol*. 2017; 241 (1): 36-44.
29. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998; 114 (4): 842-5.
30. Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? *Hepatology*. 1998; 27 (6): 1463-6.
31. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015; 149 (2): 367-78.e5; quiz e14-5.
32. Wong VW, Chitturi S, Wong GL, Yu J, Chan HL, Farrell GC. Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016; 1 (1): 56-67.
33. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016; 150 (5): 1147-59.e5.

34. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, Abdelmalek MF, Aithal GP, Caballeria J, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. 2018; 67 (5): 1754-67.
35. Armstrong MJ, Barton D, Gaunt P, Hull D, Guo K, Stocken D, et al. Liraglutide efficacy and action in non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): study protocol for a phase II multicentre, double-blinded, randomised, controlled trial. *BMJ Open*. 2013; 3 (11): e003995.
36. Misra VL, Khashab M, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009; 11 (1): 50-5.
37. Liu H, Lu HY. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (26): 8407-15.
38. Alvares-da-Silva MR, de Oliveira CP, Stefano JT, Barbeiro HV, Barbeiro D, Soriano FG, et al. Pro-atherosclerotic markers and cardiovascular risk factors one year after liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2014; 20 (26): 8667-73.
39. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007; 30 (5): 1212-8.
40. Akin L, Kurtoglu S, Yikilmaz A, Kendirci M, Elmalı F, Mazicioglu M. Fatty liver is a good indicator of subclinical atherosclerosis risk in obese children and adolescents regardless of liver enzyme elevation. *Acta Paediatr*. 2013; 102 (3): e107-13.
41. Zhou YY, Zhou XD, Wu SJ, Fan DH, Van Poucke S, Chen YP, et al. Nonalcoholic fatty liver disease contributes to subclinical atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Commun*. 2018; 2 (4): 376-92.

42. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012; 10 (6): 646-50.
43. Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ.* 2011; 343: d6891.
44. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10 (6): 330-44.
45. Barrera F, George J. Prothrombotic factors and nonalcoholic fatty liver disease: an additional link to cardiovascular risk? *Hepatology.* 2014; 59 (1): 16-8.
46. Targher G, Byrne CD. Circulating Markers of Liver Function and Cardiovascular Disease Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35 (11): 2290-6.
47. Pacifico L, Chiesa C, Anania C, De Merulis A, Osborn JF, Romaggioli S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and the heart in children and adolescents. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (27): 9055-71.
48. Sujatha R, Kavitha S. Atherogenic indices in stroke patients: A retrospective study. *Iran J Neurol.* 2017; 16 (2): 78-82.
49. Amato A, Caldara GF, Nuzzo D, Baldassano S, Picone P, Rizzo M, et al. NAFLD and Atherosclerosis Are Prevented by a Natural Dietary Supplement Containing Curcumin, Silymarin, Guggul, Chlorogenic Acid and Inulin in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients.* 2017; 9 (5).

50. Teixeira AC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL. et al . Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *J. Vasc. Bras.* 2014; 13 (2): 108-115.

51. Koeck ES, Iordanskaia T, Sevilla S, Ferrante SC, Hubal MJ, Freishtat RJ, et al. Adipocyte exosomes induce transforming growth factor beta pathway dysregulation in hepatocytes: a novel paradigm for obesity-related liver disease. *J Surg Res.* 2014; 192 (2): 268-75.

52. Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J.* 2012; 33 (10): 1190-200.

53. Linhares LMC, Oliveira CP, Alvares-da-Silva, MR, Stefano JT, Barbeiro HV, Barbeiro DF. Evolution of Biomarkers of Atherogenic Risk in Liver Transplantation Recipients. 2018. S0041-1345 (18) 30600-6.

54. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature.* 2011; 469 (7330): 336-42.

55. Willeit P, Skrobilin P, Kiechl S, Fernández-Hernando C, Mayr M. Liver microRNAs: potential mediators and biomarkers for metabolic and cardiovascular disease? *Eur Heart J.* 2016; 37 (43): 3260-6.

56. Maegdefessel L. The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2014; 276 (6): 633-44.

57. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma M, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015; 64 (5): 800-12.

58. Li X, Yang Y, Wang L, Qiao S, Lu X, Wu Y, et al. Plasma miR-122 and miR-3149 Potentially Novel Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. *PLoS One*. 2015; 10 (5): e0125430.
59. Yang J, Liu Q, Cao S, Xu T, Li X, Zhou D, et al. MicroRNA-145 Increases the Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells Induced by TRAIL through NF- κ B Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 980.
60. Mehta R, Otgonsuren M, Younoszai Z, Allawi H, Raybuck B, Younossi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ Open Gastroenterol*. 2016; 3 (1): e000096.
61. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009; 11 (3): 228-34.
62. Samir M, Vaas LA, Pessler F. MicroRNAs in the Host Response to Viral Infections of Veterinary Importance. *Front Vet Sci*. 2016; 3: 86.
63. Wu J, Song J, Wang C, Niu D, Li H, Liu Y, et al. Identification of serum microRNAs for cardiovascular risk stratification in dyslipidemia subjects. *Int J Cardiol*. 2014; 172 (1): 232-4.
64. Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell*. 2012; 3 (5): 364-71.
65. Gao W, He HW, Wang ZM, Zhao H, Lian XQ, Wang YS, et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2012; 11: 55.

66. Abente EJ, Subramanian M, Ramachandran V, Najafi-Shoushtari SH. MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Arch Biochem Biophys*. 2016; 589: 108-19.
67. Goedeke L, Salerno A, Ramírez CM, Guo L, Allen RM, Yin X, et al. Long-term therapeutic silencing of miR-33 increases circulating triglyceride levels and hepatic lipid accumulation in mice. *EMBO Mol Med*. 2014; 6 (9): 1133-41.
68. Karolina DS, Silambarasan M AA, Jeyaseelan K. MicroRNAs and Endothelial Dysfunction in Relation to Obesity and Type 2 Diabetes. In: of J, Medicine MaG, editors. 2014. p. 1-12.
69. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (5): 1516-21.
70. Zhao W, Zhao SP, Zhao YH. MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 531740.
71. Zhang X, Ji X, Wang Q, Li JZ. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Protein Cell*. 2018; 9 (2): 164-177.
72. Brandt A, Jin CJ, Nolte K, Sellmann C, Engstler AJ, Bergheim I. Short-Term Intake of a Fructose-, Fat- and Cholesterol-Rich Diet Causes Hepatic Steatosis in Mice: Effect of Antibiotic Treatment. *Nutrients*. 2017; 9 (9).
73. Ferolla SM, Armiliato GN, Couto CA, Ferrari TC. The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2014; 6 (12): 5583-99.

74. Ferolla SM, Armiliato GN, Couto CA, Ferrari TC. Probiotics as a complementary therapeutic approach in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015; 7 (3): 559-65.
75. Yan K, Garcia-Tsao G. Novel prevention strategies for bacterial infections in cirrhosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2016; 17 (5): 689-701.
76. Fukui H. Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. *World J Hepatol.* 2015; 7 (3): 425-42.
77. Kirpich I. A. The gut microbiome in NAFLD and ALD. In: Parajuli D. MCJ, editor. *Clinical Liver Disease.* 2015; 6 (3): 55–58.
78. Bieghs V, Trautwein C. The innate immune response during liver inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol.* 2013; 34 (9): 446-52.
79. Iimuro Y, Fujimoto J. TLRs, NF- κ B, JNK, and Liver Regeneration. *Gastroenterol Res Pract.* 2010;2010: 598109.
80. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl).* 2014; 92 (10): 1069-82.
81. Farrell GC, Haczeyni F, Chitturi S. Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1061: 19-44.
82. Irene P, Chiara R, Laura A, Maria GD, Melania G, Cristina F, et al. Lack of NLRP3-inflammasome leads to gut-liver axis derangement, gut dysbiosis and a worsened phenotype in a mouse model of NAFLD. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 12200.
83. Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol Rev.* 2015; 265 (1): 53-62.

84. Mokhtari Z, Gibson DL, Hekmatdoost A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. *Adv Nutr.* 2017; 8 (2): 240-52.
85. Bibbò S, Ianiro G, Dore MP, Simonelli C, Newton EE, Cammarota G. Gut Microbiota as a Driver of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018: 9321643.
86. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology.* 2016; 63 (3): 764-75.
87. Aron-Wisnewsky J, Clément K. The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nat Rev Nephrol.* 2016; 12 (3): 169-81.
88. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2013; 58 (1): 120-7.
89. Wang B, Jiang X, Cao M, Ge J, Bao Q, Tang L, et al. Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep.* 2016; 6: 32002.
90. Liu JP, Zou WL, Chen SJ, Wei HY, Yin YN, Zou YY, et al. Effects of different diets on intestinal microbiota and nonalcoholic fatty liver disease development. *World J Gastroenterol.* 2016; 22 (32): 7353-64.
91. Ishioka M, Miura K, Minami S, Shimura Y, Ohnishi H. Altered Gut Microbiota Composition and Immune Response in Experimental Steatohepatitis Mouse Models. *Dig Dis Sci.* 2017; 62 (2): 396-406.

92. Oseini AM, Cole BK, Issa D, Feaver RE, Sanyal AJ. Translating scientific discovery: the need for preclinical models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Int*. 2018; 12 (1): 6-16.
93. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol*. 2016; 65 (3): 579-88.
94. Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23 (11): 1635-48.
95. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22 (9): 1526-33.
96. Honda T, Ishigami M, Luo F, Lingyun M, Ishizu Y, Kuzuya T, et al. Branched-chain amino acids alleviate hepatic steatosis and liver injury in choline-deficient high-fat diet induced NASH mice. *Metabolism*. 2017; 69: 177-87.
97. de Lima VM, Oliveira CP, Alves VA, Chammas MC, Oliveira EP, Stefano JT, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008; 49 (6): 1055-61.
98. Cortez-Pinto H, Borralho P, Machado J, Lopes MT, Gato IV, Santos AM, et al. Microbiota Modulation With Synbiotic Decreases Liver Fibrosis in a High Fat Choline Deficient Diet Mice Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *GE Port J Gastroenterol*. 2016; 23 (3): 132-41.
99. Sanches SC, Ramalho LN, Augusto MJ, da Silva DM, Ramalho FS. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 574832.

100. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(19):2300-8.
101. Ikawa-Yoshida A, Matsuo S, Kato A, Ohmori Y, Higashida A, Kaneko E, et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol*. 2017; 98 (4): 221-33.
102. Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol*. 2008; 49 (3): 407-16.
103. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2013; 94 (2): 93-103.
104. Kishida N, Matsuda S, Itano O, Shinoda M, Kitago M, Yagi H, et al. Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine. *BMC Gastroenterol*. 2016; 16 (1): 61.
105. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology*. 2014; 146 (6): 1513-24.
106. Brenner DA, Paik YH, Schnabl B. Role of Gut Microbiota in Liver Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2015; 49 Suppl 1: S25-7.
107. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, Almeida Pereira T, de Almeida TP, Boursier J, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One*. 2015; 10 (5): e0127991.
108. Chiba T, Suzuki S, Sato Y, Itoh T, Umegaki K. Evaluation of Methionine Content in a High-Fat and Choline-Deficient Diet on Body Weight Gain and the

Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164191.

109. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79 (3): 502-9.

110. Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CB, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE. Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct*. 2016; 34 (3): 113-32.

111. Wu Y, Su SA, Xie Y, Shen J, Zhu W, Xiang M. Murine models of vascular endothelial injury: Techniques and pathophysiology. *Thromb Res*. 2018; 169: 64-72.

112. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32 (5): 1104-15.

113. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017; 816: 3-13.