



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Mariane Róvero Costa

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO LICOPENO SOBRE
PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOENÇA
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO INDUZIDA
POR DIETA HIPERCALÓRICA RICA EM CARBOIDRATOS
SIMPLES**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Renata Corrêa

**Botucatu
2019**

MARIANE RÓVERO COSTA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO LICOPENO SOBRE
PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOENÇA GORDUOSA
NÃO ALCOÓLICA DO FÍGADO INDUZIDA POR DIETA
HIPERCALÓRICA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Renata Corrêa

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Costa, Mariane Róvero.

Efeitos da suplementação do licopeno sobre processos fisiopatológicos da doença gordurosa não alcoólica do fígado induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples / Mariane Róvero Costa. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Fernando Moreto
Coorientador: Camila Renata Corrêa
Capes: 40105008

1. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 2. Dietas. 3. Carboidratos da dieta. 4. Licopeno. 5. Obesidade.

Palavras-chave: NAFLD; dieta hipercalórica; licopeno; obesidade.

Dedicatória

Primeiramente, dedico aos meus pais José Carlos e, principalmente, à minha mãe Lucélia, meu exemplo de determinação e superação, e à minha irmã Ana Paula. Obrigada por terem acreditado e investido em mim, sem o apoio de vocês jamais alcançaria meus objetivos. A presença de vocês me deu a força para seguir, pois sabia não estar sozinha. Não há meios de colocar em palavras o amor que sinto por vocês.

Dedico ao Cristiano, meu futuro esposo, que sempre se mostrou extremamente compreensivo e afetuoso em meus piores momentos. Obrigada por estar ao meu lado.

Aos amigos do laboratório pela paciência, apoio, compreensão e disposição em ajudar.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Moreto, pela oportunidade, orientação, disposição e paciência para comigo. Expresso minha gratidão pela oportunidade em tê-lo como orientador.

Agradeço à minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Camila Renata Corrêa. Pessoa maravilhosa que me acolheu em seu grupo e me inspirou em muitos momentos.

À Prof^a. Dr^a Ana Lúcia dos Anjos Ferreira.

Aos parceiros de pesquisa:

Carol Cristina Vágula, aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica,

Dra. Fabiane Valentini Francisqueti,

Artur Junio Togneri Ferron, aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica,

Ana Paula Costa Rodrigues Ferraz, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia,

Aos alunos de Iniciação Científica que sempre estiveram dispostos a ajudar,

E, em especial, à Jéssica Leite Garcia, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia, que amigavelmente me acolheu. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e, principalmente, pela amizade.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia Prof^a. Dr^a. Márcia Guimarães da Silva.

*Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia,
especialmente à secretária Vânia do Amaral Soler, sempre gentil e
prestativa.*

À todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental.

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPQ 42.42.09/2016-0) pelo suporte concedido.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
(CAPES) - Código de Financiamento 001*

Epígrafe

*“Apenas a arte e a ciência podem elevar
os homens ao nível dos deuses”*

Beethoven

Resumo

Introdução: Nos últimos anos a população mundial tem vivenciado mudanças nos hábitos alimentares, tais alterações caracterizam a transição nutricional. Ressalta-se o maior consumo de alimentos de alta densidade energética, produtos industrializados, acrescidos de açúcar e ricos em gordura e uma redução no consumo de vegetais e frutas. Este padrão alimentar é conhecido como dieta ocidental, que associada a inatividade física, reflete em alterações na composição corporal e, consequentemente, obesidade. O sobrepeso e a obesidade atualmente são um preocupante problema de saúde pública devido à elevada prevalência bem como associação com outras patologias como a doença gordurosa não alcoólica do fígado (NAFLD, do inglês *nonalcoholic fatty liver disease*). A fisiopatologia da NAFLD está amplamente relacionada aos processos oxidativo e inflamatório. Por isso, o licopeno, um carotenoide reconhecido pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória, tem sido investigado como um potencial protetor hepático na NAFLD. **Objetivo:** Investigar o efeito da suplementação com licopeno sobre os processos fisiopatológicos da NAFLD induzida por dieta hipercalórica rica em carboidrato simples. **Materiais e Métodos:** Esse estudo foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (1266/2018). Foram utilizados 24 ratos *Wistar* aleatoriamente distribuídos em 2 grupos com diferentes dietas para indução de obesidade: dieta controle (n=12) e hipercalórica (n=12). Após 20 semanas, os animais foram novamente distribuídos em 4 grupos para o estudo da suplementação com licopeno: grupo controle (Co, n=6), grupo controle suplementado com licopeno (Co+Ly, n=6), grupo obeso (Ob, n=6) e grupo obeso suplementado com licopeno (Ob+Ly, n=6). Aos grupos obesos (Ob e Ob+Ly) também foi ofertado 25% de sacarose. Os animais receberam a solução de licopeno (tomate oleoresina) diluído em óleo de milho (10mg/kg/dia) ou veículo (óleo de milho) via gavagem durante 10 semanas. Dados paramétricos estão apresentados em média e desvio padrão e não-paramétricos apresentados em mediana e intervalo interquartil e analisados por ANOVA de duas vias ou por Kruskal Wallis, respectivamente. Para análise histológica foram utilizadas as distribuições de Poisson ou Binominal. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados

estatisticamente significativos. **Resultados:** Os animais que consumiram a dieta hipercalórica apresentaram maior ganho de peso e índice de adiposidade, elevados níveis de glicemia, triglicérides plasmáticos e hepáticos, além de esteatose hepática macro e microvesicular e presença do marcador inflamatório fator de necrose tumoral- α (TNF- α) fígado. O licopeno mostrou-se eficiente no controle do perfil lipídico ao reduzir os triglicerídeos plasmáticos e hepáticos e ao aumentar a lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*), além de minimizar a esteatose microvesicular. Efeitos positivos sobre os processos inflamatório e oxidativo também foram observados. O licopeno reduziu os níveis hepáticos de TNF- α e MDA, e contribui para o melhor desempenho do sistema antioxidante do órgão ao amplificar a atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). **Conclusão:** O licopeno parece ser um notável coadjuvante na terapia da obesidade e suas doenças correlatas como a NAFLD, já que contribui para a modulação de processos fisiopatológicos relacionados à doença.

Palavras-chave: dieta hipercalórica, obesidade, NAFLD, licopeno.

Abstract

Introduction: In recent years the world population has experienced changes in eating habits, which characterize the nutritional transition. Higher consumption of high energy density foods, industrialized products, high sugar and high fat products, and a reduction in the consumption of vegetables and fruits are also noteworthy. This dietary pattern is known as western diet, which associated with physical inactivity, reflects on changes in body composition and consequently obesity. Overweight and obesity are currently a worrying public health problem due to the high prevalence as well as association with other pathologies such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The pathophysiology of NAFLD is largely related to oxidative and inflammatory processes. Therefore, lycopene, a carotenoid recognized for its antioxidant and anti-inflammatory action, has been investigated as a potential liver protector in NAFLD. **Aim:** To investigate the effect of lycopene supplementation on the pathophysiological processes of NAFLD induced by a simple carbohydrate-rich hypercaloric diet. **Materials and Methods:** This study was approved by the Animal Ethical Committee of Botucatu Medical School (1266/2018). 24 *Wistar* rats were randomly distributed in 2 groups with different diets for obesity induction: control diet (n=12) and hypercaloric (n=12). After 20 weeks, the animals were redistributed in 4 groups for the study of lycopene supplementation: control group (Co, n=6), control group supplemented with lycopene (Co+Ly, n=6), obese group (Ob, n=6) and obese group supplemented with (Ob+Ly, n=6). Obese groups (Ob and Ob + Ly) also received 25% sucrose. The animals received the solution of lycopene (oleoresin tomato) diluted in corn oil (10mg/kg/day) or vehicle (corn oil) via gavage for 10 weeks. Parametric data are presented in mean and standard deviation and non-parametric data presented in median and interquartile range and analyzed by two-way ANOVA or by Kruskal Wallis, respectively. For histological analysis, Poisson or Binominal distributions were used. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant. **Results:** The animals, which consumed the hypercaloric diet, presented greater weight gain and adiposity index, high glycemia levels, plasma and hepatic triglycerides, besides macro and microvesicular hepatic steatosis and presence and presence of the inflammatory marker tumor necrosis

factor- α (TNF. Lycopene has been shown to be efficient in controlling the blood and liver lipid profile by reducing plasma and liver triglycerides and increasing high-density lipoprotein (HDL), in addition to minimizing microvesicular steatosis. Positive effects on inflammatory and oxidative processes were also observed. Lycopene reduced hepatic levels of TNF- α and malondialdehyde (MDA) and contributed to improve the performance of the antioxidant liver system by amplifying the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes. **Conclusion:** Lycopene seems to be a remarkable adjunct in the therapy of obesity and its related diseases such as NAFLD, since it contributes to the modulation of pathophysiological processes related to the disease.

Key words: hypercaloric diet, obesity, NAFLD, lycopene.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Visão tridimensional do lóbulo hepático.....	30
Figura 2. Diferenças dos hepatócitos nas regiões perilobular, intermediária e centrolobular.....	31
Figura 3. Interação entre o metabolismo da glicose e da frutose.....	34
Figura 4. Representação esquemática da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante.....	38
Figura 5. Inflamação e produção de espécies reativas do oxigênio.....	41
Figura 6. Resumo da influência da dieta sobre a progressão da NAFLD.....	45
Figura 7. Fórmula estrutural do licopeno.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais fontes de licopeno.....46

Tabela 2. Conteúdo de licopeno dos principais alimentos à base de tomate.....47

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACR	Acroleína
AGEs	Produtos da glicação avançada, do inglês <i>advanced glycation end-products</i>
ALEs	lipoxidação avançada, do inglês <i>advanced lipoxidation end-products</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATPIII	<i>Adult Treatment Panel III</i>
CAC	Ciclo do ácido cítrico
CAT	Catalase
CD36	Grupamento de diferenciação, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
CER	Ceramidas
ChREBP	Elemento de resposta a carboidratos, do inglês <i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CK	Ciclo de Krebs
DAG	Diacilglicerol
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos, do inglês <i>damage-associated molecular patterns</i>
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FID	Federação Internacional de Diabetes
GLUT	Transportador de glicose, do inglês <i>glucose transporter</i>
GSH	Glutationa reduzida
GPX	Glutationa peroxidase
GSR	Glutationa redutase
GSSH	Glutationa oxidada
GO	Glioxal
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density</i>

	<i>lipoprotein</i>
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Mudança de estilo de vida
MDA	Malondialdeído
MGO	Metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NADPH oxidase (Nox)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Esteatohepatite não alcoólica, do inglês <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OH•	Radical hidroxil
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
RAGE	Receptor para produtos da glicação avançada
RE	Retículo endoplasmático

SGLT	Transportador de glicose dependente de sódio, do inglês <i>sodium-dependent glucose co-transporter</i>
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SREPB1c	Elemento regulatório de esterol 1c, do inglês <i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
SR-BI	Transportador de membrana de colesterol receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I, do inglês <i>scavenger receptor class B type I</i>
TA	Tecido adiposo
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRLs	Receptores do tipo Toll, do inglês <i>toll-like receptors</i>
UPR	Resposta a proteína mal envelopada, do inglês <i>unfolded protein response</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>very low density lipoprotein</i>

Sumário

CAPÍTULO I – Revisão de literatura

1. Obesidade.....	27
2. O Fígado e sua Fisiologia.....	29
2.1. Funções do Fígado.....	32
2.1.1. Metabolismo dos Carboidratos.....	32
2.1.2. Metabolismo dos Lipídios.....	33
3. A Doença Gordurosa não Alcohólica do Fígado	35
3.1. Patogênese	35
3.1.1. Fatores Dietéticos.....	36
3.1.2. Estresse Oxidativo.....	37
3.1.3. Estresse do Retículo Endoplasmático	39
3.1.4. Inflamação.....	40
3.1.5. Microbiota Intestinal.....	42
3.1.6. Disfunção do Tecido Adiposo.....	42
3.2. Tratamento	44
4. Licopeno	45
4.1. Fontes Dietéticas.....	46
4.2. Biodisponibilidade	47
4.3. Absorção	48
4.4. Distribuição nos Tecidos	49
5. Considerações Finais	49
6. Justificativa.....	50
7. Objetivos	50
7.1. Objetivo Geral	50
7.2. Objetivos Específicos	50
Referências bibliográficas.....	51

CAPÍTULO II – Artigo científico

Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats.....	60
--	-----------

CAPÍTULO III – Conclusão

Conclusão.....	95
ANEXO	96

Capítulo I
Revisão de Literatura

1. Obesidade

Nos últimos anos a população mundial tem vivenciado mudanças nos hábitos alimentares e nos padrões de atividade física que refletem em alterações na composição corporal e maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (1). À este cenário conhecido como transição nutricional, atribui-se como principais mudanças observadas o aumento da disponibilidade e consumo de produtos ultraprocessados, alimentos de origem animal, óleos e refrigerantes acompanhados por uma redução no consumo de vegetais, frutas e leite (2). Destaca-se o consumo de alimentos e bebidas acrescidos de açúcar que conduzem ao ganho de peso, à hiperglicemia e, conseqüentemente, a efeitos metabólicos deletérios (3).

O controle ponderal deve ser visto como uma complexa interação entre o atual ambiente obesogênico e fatores genéticos, sendo que o comportamento alimentar em resposta à estas condições desempenha um papel dominante na prevalência da obesidade (4). Assim, o incremento do consumo calórico, ou seja, a ingestão de alimentos de alta densidade energética resulta em um desequilíbrio entre o consumo e o gasto calórico levando à um estado de balanço energético positivo associado ao sobrepeso e obesidade (3). Condições que tem aumentado de forma alarmante em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos acima de 18 anos estavam acima do peso e destes mais de 650 milhões eram obesos (5). Recente pesquisa divulgada pelo Ministério da Saúde (MS) em 2017 apontou que a prevalência de obesidade aumentou de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016 o que representa um aumento de 60% em 10 anos (6). Projeções para 2030 estimam que 38% da população mundial adulta apresentará sobrepeso e 20% obesidade(7). À vistas desses dados a obesidade representa um grande problema para a saúde pública, impactando de forma imponente na expectativa e na qualidade de vida da população. De forma que o excesso de gordura está associado à diversas morbidades dentre elas alterações hepáticas, câncer, asma, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes tipo 2 (8,9).

A perniciosidade da obesidade, entretanto, não está associada apenas ao total de gordura corporal, mas também ao padrão de deposição desta gordura. O excesso de gordura visceral, conhecido como obesidade central, reflete em uma maior circunferência da cintura e tem uma forte associação com doenças cardiovasculares (10), além de estar especialmente associada à resistência à insulina e diabetes tipo 2 (11). Fundamentada neste contexto, encontra-se a Síndrome Metabólica (SM), Síndrome da Resistência à Insulina ou Síndrome-X, termos que designam um grupo de alterações metabólicas que compartilham seus mecanismos fisiopatológicos e estão associadas ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (12). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (FID), para o diagnóstico de SM é necessário a presença de circunferência da cintura aumentada mais dois fatores dentre quatro: hipertrigliceridemia, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*), hipertensão arterial ou hiperglicemia ou, então, diagnóstico prévio de diabetes tipo 2 (13). Para a *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)* 2005 a presença de pelo menos 3 dos fatores acima citados caracteriza a SM (14).

Atualmente, a SM representa um preocupante problema de saúde mundialmente reconhecido, afetando mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo. Além do mais, a SM está associada a outras condições patológicas (15). O acúmulo de gordura no fígado na ausência do consumo de álcool conhecido como doença gordurosa não alcoólica do fígado (NAFLD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*) é considerado por muitos autores como uma manifestação da SM no fígado (16). Neste cenário, a NAFLD vem ganhando atenção sendo a SM um importante fator preditor para seu desenvolvimento. Consta ainda na literatura, evidências de que a NAFLD *per se* é fator de risco para doenças cardiovasculares (17). Na atualidade, a NAFLD representa a principal causa de dano hepático, englobando um conjunto de alterações hepáticas desencadeadas pelo acúmulo de gordura no órgão, incluindo desde a simples esteatose à esteatohepatite não alcoólica (NASH, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*), podendo progredir à cirrose e hepatocarcinoma (18).

2. O Fígado e sua Fisiologia

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano, representando aproximadamente 2 a 3% do peso corporal. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal (19). É um órgão de extrema importância para a manutenção da homeostase corporal representando a ligação entre o sistema digestório e o circulatório. Aproximadamente 80% do suprimento sanguíneo hepático deriva da veia porta que transporta o sangue pouco oxigenado, porém rico em nutrientes, oriundo da digestão. O restante, 20%, deriva da artéria hepática que conduz o sangue rico em oxigênio (20). Anatomicamente, o fígado é dividido em lobo direito e lobo esquerdo de acordo com as ramificações da veia porta e ainda lobo caudado, localizado próximo a veia cava, e lobo quadrado, situado próximo a vesícula biliar (21).

O parênquima hepático é constituído por hepatócitos que se dispõem radialmente ao redor da veia central ou centrolobular nos lóbulos hepáticos, unidade estrutural do fígado. Nos vértices dos lóbulos hepáticos, o conjunto de tecido conjuntivo, ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos é denominado espaço porta. Os espaços entre os cordões de hepatócitos contêm os sinusóides hepáticos que demarcam o espaço de Disse. Para além das células endoteliais, os sinusóides apresentam as células de Kupffer, macrófagos responsáveis por processos imunológicos e destruição de hemácias. Ainda no espaço de Disse há as células de Ito ou células estreladas, que contêm inclusões lipídicas ricas em vitamina A e possuem um importante papel no desenvolvimento da fibrose em condições patológicas (Figura 1) (22).

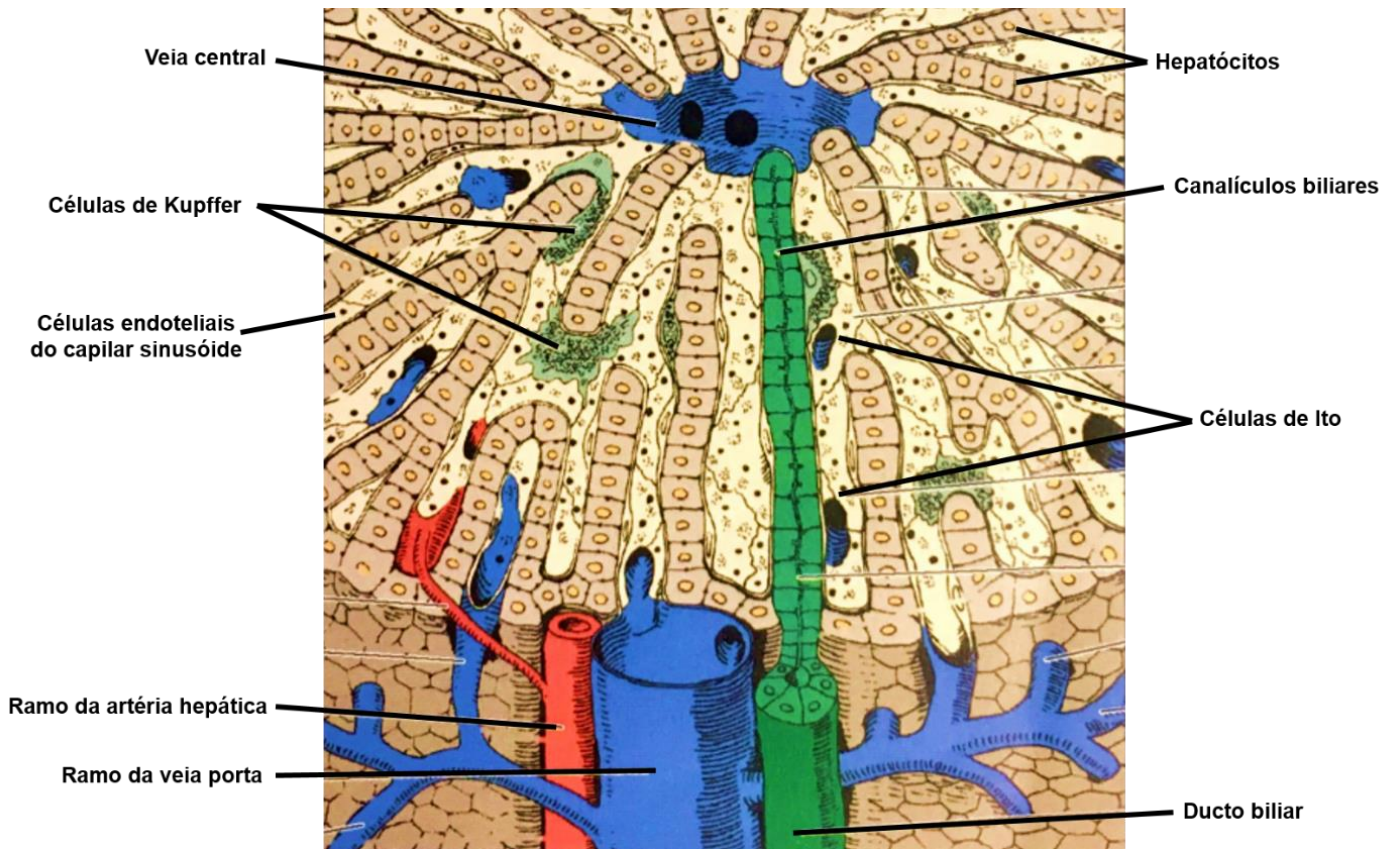


Figura 1. Visão tridimensional do lóbulo hepático. No centro, encontra-se a veia central. Abaixo, ramos da veia porta, artéria hepática e ducto biliar compreendendo o espaço porta. Observar células endoteliais do capilar sinusóide, células de Kupffer e células de Ito. Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2008 (23).

Nos lóbulos hepáticos o sangue, quer arterial ou quer venoso, flui da periferia para a região central. Tal fato pode explicar o comportamento diferente das células perilobulares e centrolobulares frente a agentes nocivos ou condições patológicas. Os hepatócitos à medida que se distanciam do espaço porta apresentam diferenças quanto as suas características estruturais, histoquímicas e bioquímicas o que permite a divisão do lóbulo hepático em 3 zonas distintas. A zona 1 inclui as células da periferia, região perilobular, que corresponde a zona mais oxigenada, o que explica o fato dos hepatócitos desta zona apresentarem mais enzimas do metabolismo oxidativo. A zona 2 corresponde aos hepatócitos intermediários. As células localizadas nas

adjacências da veia central configuram a zona 3, região centrolubular que recebe menor concentração de nutrientes e de oxigênio (Figura 2) (22).

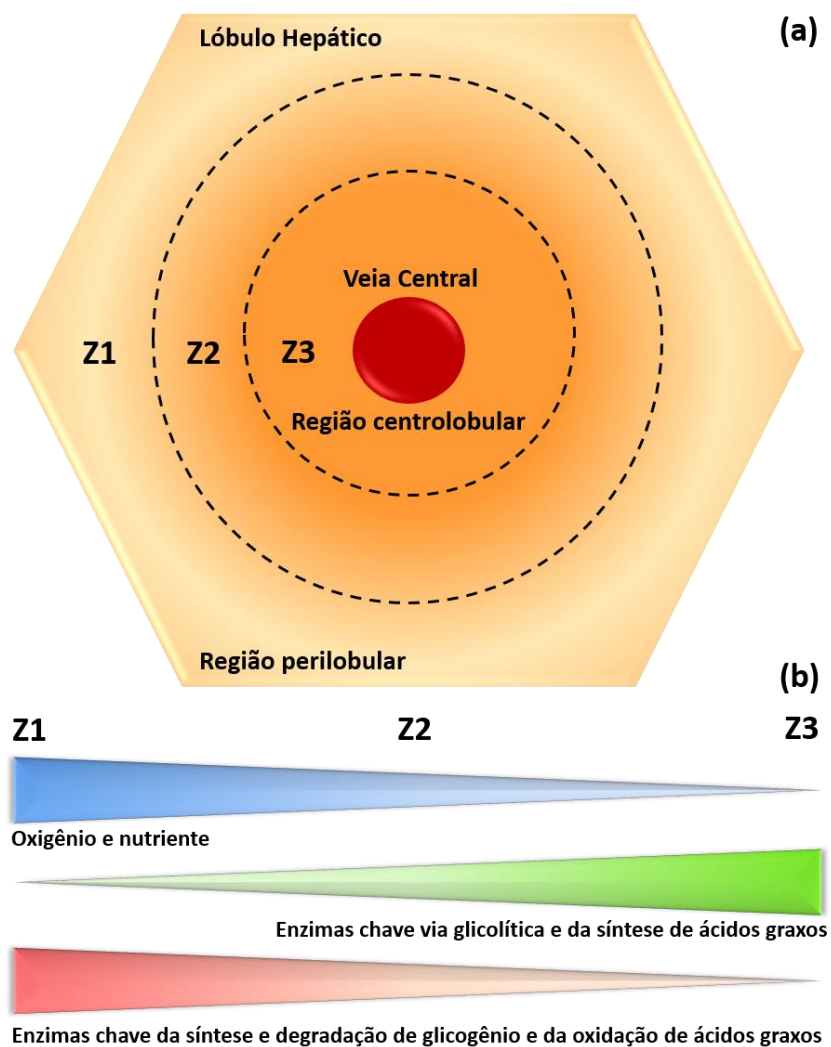


Figura 2. Divisão e heterogeneidade dos hepatócitos nas diferentes regiões do lóbulo hepático. (a) Divisão do lóbulo hepático em zonas: Zona 1 (Z1), perilobular; Zona 2 (Z2), intermediária; Zona 3 (Z3), centrolubular. (b) Heterogeneidade dos hepatócitos: hepatócitos dispostos na Z1 recebem maior aporte de oxigênio e nutrientes o que explica a maior presença de enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio e oxidação de ácidos graxos; hepatócitos presentes na Z3 diferem-se pela maquinaria enzimática relacionada à via glicolítica e a síntese de ácidos graxos.

2.1. Funções do Fígado

O fígado desempenha funções vitais para o organismo como a produção e secreção de bile, síntese proteica e de outras moléculas, armazenamento de vitaminas e ferro, inativação e excreção de drogas e toxinas e função imunológica. Além disso, o fígado orchestra o metabolismo energético o qual será brevemente abordado com ênfase para o metabolismo dos carboidratos e lipídios (22).

2.1.1. Metabolismo dos Carboidratos

Após o processo de digestão, no intestino, ocorre a absorção da glicose através de 2 mecanismos: o co-transporte com o sódio através do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT, do inglês *sodium-dependent glucose co-transporter*) e o transporte facilitado mediado pelo transportador de glicose 2 (GLUT2, do inglês *glucose transporter*) (24). Uma vez na circulação, os carboidratos são encaminhados para o fígado através da veia porta. Por meio do GLUT2, a glicose adentra o hepatócito e pode percorrer os seguintes destinos: 1) ser oxidada através da glicólise gerando o piruvato, que na mitocôndria, é oxidado para gerar adenosina trifosfato (ATP) através do Ciclo de Krebs (CK) ou do Ácido Cítrico (CAC) e da fosforilação oxidativa; 2) a glicose-6-fosfato, um metabólito da via glicolítica, também pode ser metabolizado através da via das pentoses fosfato gerando ribose-5-fosfato, para a síntese de ácidos nucleicos, e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), requerido por processos biossintéticos; 3) a glicose por ser armazenada na forma de glicogênio; 4) ou ainda, pode ser utilizada para a síntese de polímeros estruturais. A ativação de vias oxidativas ou de armazenamento é dependente do estado energético da célula e, em frente à abundância de substrato a acetil coenzima A (acetil-CoA), formada a partir do piruvato, ao invés de seguir para a oxidação via CK, segue para a síntese de ácidos graxos via lipogênese *de novo*. Os ácidos graxos formados podem ser armazenados na forma de triglicerídeos (25).

Outro monossacarídeo que merece atenção é a frutose. Carboidrato que tem sido amplamente adicionado a alimentos e bebidas industrializadas por

tornar esses produtos mais palatáveis (26). Atualmente, o açúcar tem sido associado à morbidades, em especial à NAFLD, devido às características de seu metabolismo. A absorção luminal da frutose pelos enterócitos se dá através do GLUT5 e desses para a circulação através do GLUT2 (27). Uma vez na circulação portal a frutose é extensamente absorvida pelo fígado através dos GLUT 2, 5 e 8 (28). No fígado, a frutoquinase inicia o catabolismo da frutose (frutólise) formando a frutose-1-fosfato que é metabolizada a diidroxicetona fosfato e gliceraldeído que são o ponto em comum entre o metabolismo da glicose e da frutose (Figura 3). Esses compostos podem ser metabolizados à glicose, gerar energia na forma de ATP através das vias oxidativas ou formar ácidos graxos via lipogênese *de novo* de acordo com o estado energético da célula. Considerando que o catabolismo da frutose ignora os mecanismos regulatórios da glicólise, seu elevado consumo rapidamente gera substrato para a via lipogênica o que possibilita o armazenamento na forma de triglicerídeos (29).

2.1.2. Metabolismo dos Lipídios

Os lipídios dietéticos após absorvidos deixam o intestino sob a forma de quilomícrons através do sistema linfático, alcançam a circulação sanguínea. A apolipoproteína CII, presente nos quilomícrons, ativa a lipase lipoproteica (LPL) nos capilares do tecido adiposo, coração e músculo esquelético levando a saída de ácidos graxos livres para esses tecidos. Os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado. Nos hepatócitos, os ácidos graxos podem ser oxidados através da β -oxidação gerando energia. Quando os ácidos graxos da dieta superam a necessidade energética do fígado, são exportados, na forma de triglicerídeos, através da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), ou mediante a saturação desse mecanismo podem ser armazenados em gotículas lipídicas. Do fígado, as VLDLs são transportadas pelo sangue para o músculo e tecido adiposo onde, novamente, através da LPL os ácidos graxos livres são liberados. A perda de triglicerídeos pela VLDL a converte na lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density*

lipoprotein) que transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos. Através do receptor de LDL as lipoproteínas são incorporadas pelo hepatócito e seu conteúdo convertido em ácidos biliares (30). O fígado e também o intestino produzem a HDL, responsável pelo chamado transporte reverso do colesterol, captando o colesterol dos tecidos extra-hepáticos e encaminhando-os para o fígado (31).

Neste cenário, o fígado representa um órgão chave no controle do metabolismo de nutrientes adaptando-se a situações de carência e excesso (32). Nesta última situação, a abundância de macronutrientes, em especial açúcares e gorduras, está associada a um prejuízo na função hepática de administrar o volume de triglicerídeos formado, levando ao seu acúmulo e desenvolvimento da NAFLD (32,33).

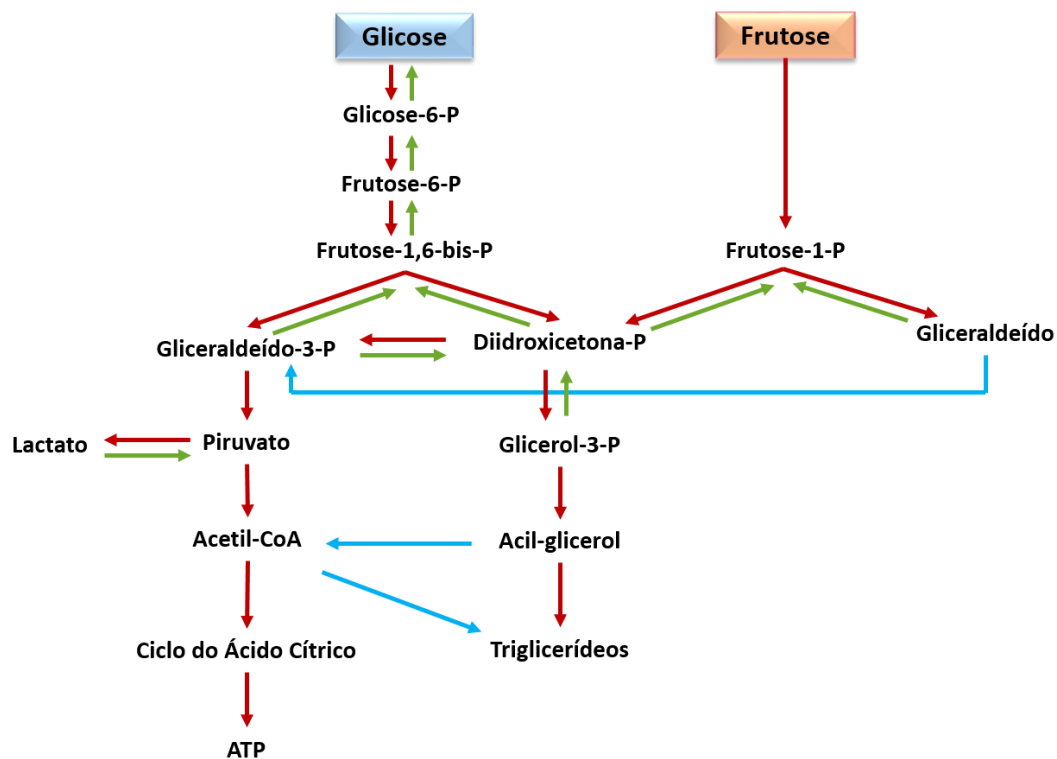


Figura 3. Interação entre o metabolismo da glicose e da frutose. É possível observar que o metabolismo de ambos monossacarídeos, glicose e frutose, pode contribuir para a produção de energia (ATP), ao fornecer substrato para as vias oxidativas. Entretanto, de acordo com o estado energético celular, triglicerídeos podem ser formados.

3. A Doença Gordurosa não Alcolica do Fígado

A NAFLD é definida pelo acúmulo de triglicerídeos no citoplasma do hepatócito, excedendo 5% do peso do fígado, na ausência de outras causas de acometimento hepático. O diagnóstico diferencial deve excluir hepatites virais, e outras doenças hepáticas crônicas como doença de Wilson, hemocromatose, hepatite autoimune e doença colestática do fígado além de lipodistrofia, doença celíaca, doença de Cushing, uso de alguns medicamentos e consumo excessivo de álcool (34).

Como visto a NAFLD apresenta uma importante relação com a obesidade e a SM. Embora existam outros fatores considerados de risco para a progressão e severidade da doença (35), sua prevalência tem acompanhado o crescimento da obesidade (36). Atualmente, estima-se que mais de 25% da população mundial apresente NAFLD, sendo as regiões do Oriente Médio e América do Sul de maior prevalência e a África de menor (37). Projeções estimam que o custo para os cuidados de pacientes portadores de NAFLD, no Estados Unidos, aumentará em 18% de 2000 para 2035 (34).

Tendo em vista a gravidade do acometimento hepático, levando-se em consideração a prevalência e consequências do acúmulo lipídico, pesquisas devem ser conduzidas para o entendimento de sua fisiopatologia e tratamento.

3.1. Patogênese

Embora não totalmente esclarecida algumas teorias foram postuladas no sentido de explicar a patogênese da NAFLD. Uma delas é a hipótese “*two hit*” na qual o acúmulo hepático de gordura ocorre por meio de dois insultos (*hit*) ao órgão. O primeiro é caracterizado por um desbalanço no metabolismo lipídico em que o influxo de ácidos graxos representado pela importação, síntese *de novo* e fonte dietética, excede o efluxo hepático, ou seja, o catabolismo de ácidos graxos e a exportação de lipoproteínas (38). Um estudo realizado com marcador, curiosamente demonstrou a contribuição de cada fonte para o acúmulo intra-hepático de lipídios. Dos triglicerídeos intra-hepáticos dos pacientes portadores de NAFLD que participaram do experimento ~59% foram derivados de ácidos

graxos circulantes, ~26% da lipogênese *de novo* e ~15% da gordura dietética (39). Esse desequilíbrio entre influxo e efluxo resulta no acúmulo lipídico pelo hepatócito. O segundo *hit* envolve um processo inflamatório e estresse oxidativo levando a danos à células e componentes celulares associados a progressão à NASH (38).

Entretanto, atualmente sabe-se que o desenvolvimento da NAFLD é complexo e envolve uma série de fatores, sendo postulada a hipótese de múltiplos insultos (“*multiple hit*”). De acordo com esta teoria, a NAFLD seria resultado de uma complexa interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos, fatores comportamentais, nutricionais, estresse oxidativo e inflamação (40). Independentemente da teoria três importantes aspectos reciprocamente dependentes desempenham um papel central no desenvolvimento da NAFLD: hábitos alimentares, estresse oxidativo e inflamação.

3.1.1. Fatores Dietéticos

O elevado consumo de gorduras e carboidratos, em especial a frutose, está associado à deposição hepática de lipídio. Uma recente revisão apontou um alto consumo de carne vermelha, gordura e açúcar em detrimento ao consumo de grãos integrais, frutas e vegetais em pacientes com NAFLD. Salientou ainda uma relação positiva entre o padrão de dietético ocidental e o risco de NAFLD (41). A influência do consumo alimentar e alterações hepáticas é tão clara que a mudança no estilo de vida é um importante tratamento encontrado em *guidelines* para NAFLD (42).

A presença de combustível metabólico além das necessidades energéticas, ou seja, quando o consumo de macronutrientes supera a necessidade de ATP do organismo, o excesso será armazenado na forma de triglicerídeos. Nesta situação, os macronutrientes são convertidos em acetil-coA, molécula comum ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. O acetil-coA, além de ser substrato para a produção de energia é precursor da síntese de ácidos graxos. Os ácidos graxos formados podem ser exportados do fígado

na forma de triglicerídeos através da VLDL, culminando no aumento dos níveis de VLDL circulantes (27). Como mencionado anteriormente, a saturação desse mecanismo de exportação culmina no armazenamento de triglicerídeos pelo hepatócito, conhecida como esteatose hepática (30).

Outros mecanismos contribuem para o desenvolvimento da esteatose. O metabolismo da frutose leva a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta à carboidratos (ChREBP, do inglês *carbohydrate response element-binding protein*) independentemente da sinalização da insulina. O ChREBP é um fator de transcrição para genes envolvidos na síntese de triglicerídeos. Outro fator de transcrição para genes da lipogênese é a proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1c (SREPB1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein 1c*) fortemente estimulado pela insulina. A obesidade, plano de fundo da NAFLD, comumente está associada à resistência à insulina e hiperinsulinemia, o que promove a hiperativação do SREPB1c e consequente síntese hepática de lipídios (43). Adicionalmente, na condição de resistência à insulina o tecido adiposo torna-se resistente ao efeito antilipolítico da insulina o que impulsiona o fluxo de ácidos graxo derivados da lipólise do tecido para o fígado contribuindo para a esteatose hepática (44).

3.1.2. Estresse Oxidativo

A maior disponibilidade de acetil-coA decorrente da oxidação de carboidratos e lipídios disponíveis para participar do ciclo do CK e da fosforilação oxidativa leva à uma excessiva estimulação da mitocôndria (45). Durante esse processo, elétrons escapam da cadeia transportadora de elétrons reagindo com o oxigênio (O_2) formando o superóxido (O_2^-) que é impermeável a membrana mitocondrial. Através da enzima superóxido dismutase (SOD) o O_2^- é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) são responsáveis pela redução do H_2O_2 em água (H_2O) (46). Em excesso, o H_2O_2 pode deixar a mitocôndria e ser reduzido pelas reações de Fenton ou Haber-Weiss formando o radical hidroxil ($OH^\bullet$). Esta é uma molécula altamente reativa que pode levar a danos oxidativos importantes (Figura 4) (47).

A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pela mitocôndria representa um ciclo contínuo contrabalanceado pelas enzimas antioxidantes (48). Entretanto, a estimulação excessiva pela abundância de substrato leva à superprodução de EROs e depleção dos mecanismos antioxidantes resultando em um desbalanço entre a produção de oxidantes e o sistema de defesa antioxidante o que compreende o estresse oxidativo (47).

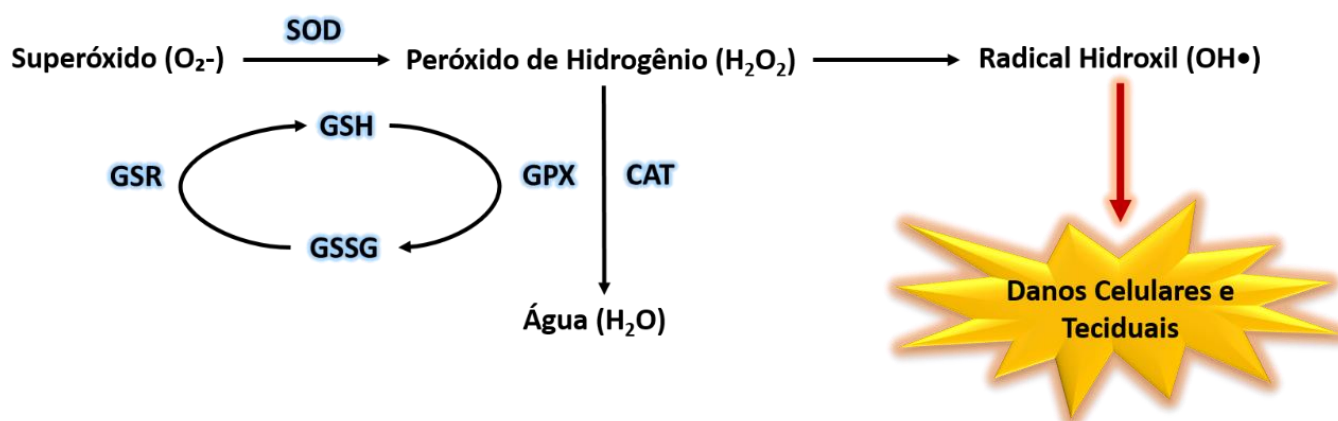


Figura 4. Representação esquemática da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante. Elétrons podem escapar da cadeia transportadora de elétrons e reagir com o oxigênio formando espécies reativas do oxigênio. As enzimas SOD, CAT e GPX são responsáveis pela redução das espécies reativas em água. Em excesso, o peróxido de hidrogênio pode reagir com o superóxido ou metais formando o radical hidroxil que está associado à danos celulares e teciduais. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPX: glutathione peroxidase; GSSG: glutathione oxidada; GSR glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida.

As EROs podem interagir com moléculas funcionais e estruturais como o ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, carboidratos e proteínas modificando sua estrutura e formando produtos que também apresentam capacidade reativa (49). A oxidação de lipídios gera como produtos o 4-hidroxinonenal (4-HNE), acroleína (ACR) e malondialdeído (MDA), já a oxidação de carboidratos forma o metilglioxal (MGO) e glioxal (GO). Esses subprodutos são denominados, respectivamente, produtos da lipoxidação avançada (ALEs, do inglês *advanced*

lipoxidation end-products) e produtos da glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*) (50).

O estresse oxidativo está associado à danos no DNA mitocondrial além de alterações estruturais da organela o que contribui para a progressão da NAFLD (51). Estas alterações são acompanhadas por um prejuízo das funções metabólicas e bioenergéticas da mitocôndria incluindo a, anteriormente discutida, superprodução de EROs e diminuição da produção de ATP, características da disfunção mitocondrial (52). Em adição, a cardiolipina, um fosfolípido exclusivamente encontrado na membrana mitocondrial interna e necessário para a adequada formação da crista mitocondrial, é suscetível à danos oxidativos. A oxidação da cardiolipina induz a ativação de mecanismos apoptóticos levando à morte celular (53). Além do mais, anormalidades mitocondriais conduzem ao acúmulo de ácidos graxos não metabolizados no citosol (54). A oxidação ineficiente leva ao acúmulo de intermediários lipotóxicos como o diacilglicerol (DAG) e as ceramidas (CER). Estes produtos podem prejudicar a sinalização da insulina e mediar a inflamação no hepatócito (55,56)

3.1.3. Estresse do Retículo Endoplasmático

O ácido graxo dietético pode interferir no equilíbrio do retículo endoplasmático (RE) levando ao seu estresse por mecanismos ainda investigados (57). Por sua vez, o estresse do RE pode induzir à esteatose hepática através de efeitos sobre a síntese lipídica e inflamação (58). No fígado, além de sua conhecida função no controle de qualidade das proteínas, o RE está envolvido na síntese e metabolismo lipídico. Em condições estressoras ocorre ativação de vias de sinalização específica denominada resposta à proteína mal envelopada (UPR, do inglês *unfolded protein response*), com o objetivo de restaurar a homeostase do RE (54). A ativação da UPR leva a indução da sinalização inflamatória através da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um importante fator envolvido na sinalização de citocinas inflamatórias (58).

Tanto o estresse do RE quanto a carbonilação de proteínas relacionados ao ambiente celular pró-oxidante estão associados à alterações estruturais de

proteínas. A apolipoproteína B, essencial para a formação do VLDL, é uma das moléculas passíveis de danos o que pode prejudicar a exportação de lipídios do fígado e, conseqüentemente, exacerbar a esteatose no órgão (45).

3.1.4. Inflamação

A inflamação é uma resposta de proteção à agentes nocivos ou injúria, essencial para eliminar/neutralizar organismos ou corpos estranhos (59). Essa resposta inclui a participação de inúmeros tipos celulares como granulócitos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (60). Entretanto, a ativação crônica do processo inflamatório está relacionado com a maciça produção de citocinas e promoção do estresse oxidativo (61).

As citocinas secretadas pelas células imunes atuam como mensageiros intracelulares recrutando e ativando células fagocíticas contribuindo para a exacerbação do processo inflamatório. A ativação de fagócitos em resposta aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e padrões moleculares associados à danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), e a ligação de citocinas a seus receptores são responsáveis pela produção de espécies reativas através da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidases ou Nox) e mieloperoxidase (MPO). Esta produção ocorre por reações de oxidação com o objetivo de ampliar a resposta inflamatória e destruir micro-organismos e debris celulares. Entretanto, dada a estimulação excessiva dessas células ocorre danos ao tecido hepático (Figura 5) (62).

AGEs e ALEs interagem com o receptor para produtos da glicação avançada (RAGE), que atende ao padrão DAMP de reconhecimento molecular, contribuindo para o processo inflamatório (63). Já que ao ser ativado o RAGE estimula a translocação do NF- κ B para o núcleo levando a transcrição e expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (64). Portanto, pode-se estabelecer uma relação de retroalimentação positiva entre o estresse oxidativo e a inflamação.

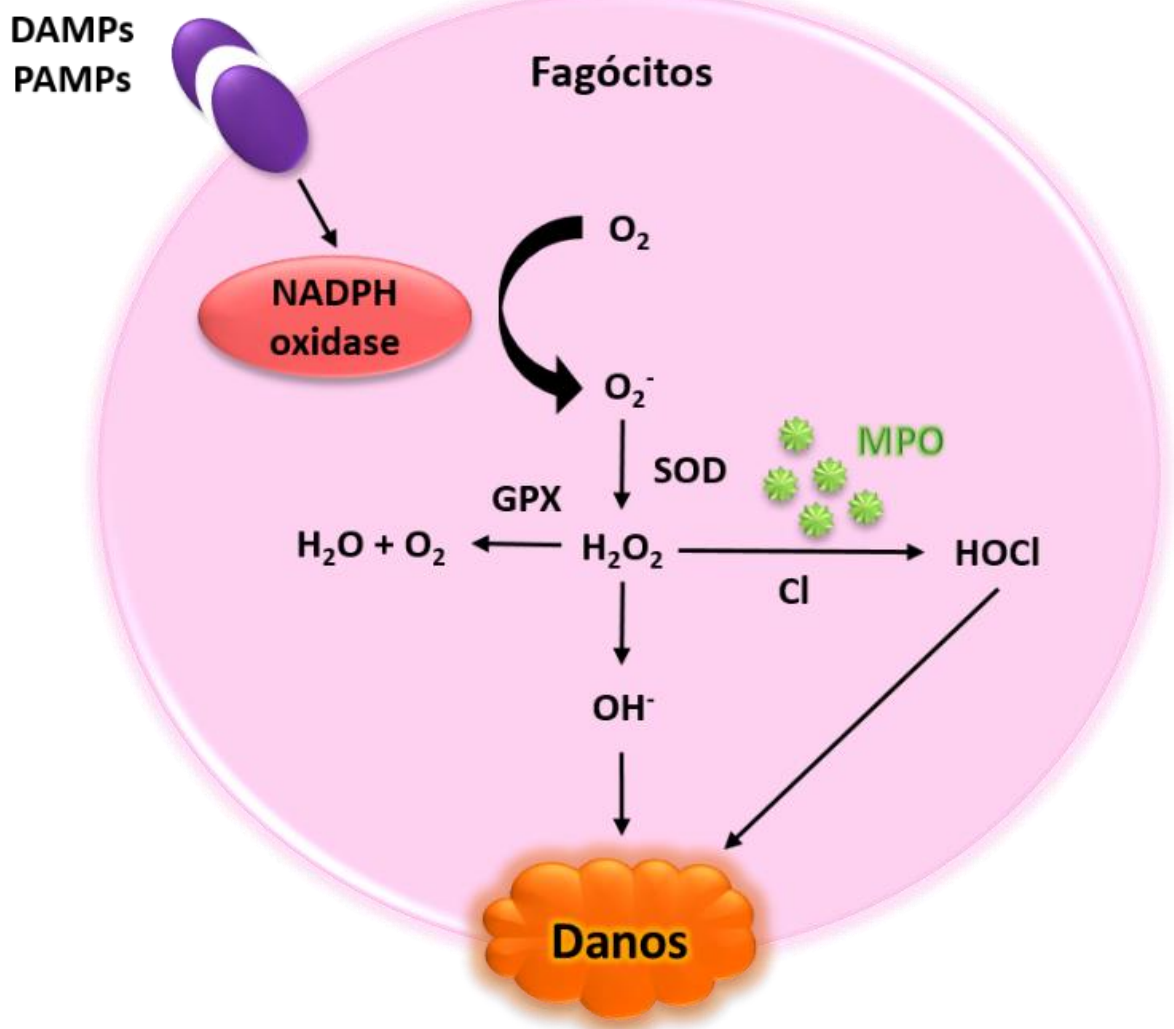


Figura 5. Inflamação e produção de espécies reativas do oxigênio. Moléculas DAMPs e PAMPs ativam fagócitos por meio da ligação a seus receptores. Em seguida, a NADPH oxidase produz o superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que ao sofrer a ação da superóxido dismutase (SOD) é convertido em peróxido de hidrogênio que, por sua vez, pode ser convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Porém, com o intuito de neutralizar o agente agressor a mieloperoxidase (MPO) converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso ($HOCl$). Este ácido além de atuar no fagossomo é lançado para o meio extracelular. Diante de um estímulo contínuo ou exacerbado esse mecanismo leva à danos celulares e teciduais devido a produção aumentada de espécies reativas e ácido hipocloroso. PAMPs: do inglês pathogen-associated molecular patterns; DAMPs: damage-associated molecular patterns; GPX: glutatona peroxidase; CAT: catalase.

3.1.5. Disbiose Intestinal

A microbiota intestinal é definida como um complexo de espécies de micro-organismos que habitam o trato digestivo e mantém uma relação de simbiose com o hospedeiro contribuindo para diversas funções como digestão, síntese de vitaminas e bloqueio da colonização intestinal por patógenos (65). Grande parte do aporte sanguíneo hepático tem origem do trato digestório. Por isso, sua posição anatômica, em situação fisiológica, o coloca como primeira linha de defesa contra componentes bacterianos (66).

O intestino é revestido por uma camada de muco e pelo seu microbioma, que contribuem para a integridade da barreira intestinal, sendo sensíveis à alterações da dieta. O padrão dietético ocidental está associado à alterações no microbioma e aumento da permeabilidade intestinal possibilitando, consequentemente, a translocação bacteriana resultando em lipopolissacaridemia (67).

Em decorrência, no fígado há ativação da resposta inflamatória através da ligação de antígenos aos receptores do tipo Toll (TRLs, do inglês *toll-like receptors*) com, consequente, produção de citocinas inflamatórias e EROs (68). Além do mais, esta via inflamatória também pode ser ativada por ácidos graxos saturados presentes na dieta que, devido a estrutura similar aos lipopolissacarídeos (LPS), são capazes de ativar o TLR4 o que contribui para a lesão hepática (69).

3.1.6. Disfunção do Tecido Adiposo

O tecido adiposo (TA) até quase 25 anos atrás era considerado um tecido inerte. Entretanto, após a descoberta da leptina passou a ser considerado um órgão metabolicamente ativo com funções para além de metabólicas, mas endócrinas e imunológicas. Tal condição, entretanto, também o faz compor da patogênese de desordens metabólicas incluindo diabetes mellitus tipo 2 e NAFLD (70). O TA é altamente sensível a alterações no suprimento de nutrientes contribuindo para homeostase energética do organismo. Em frente ao excesso de nutrientes TA responde através da hiperplasia e hipertrofia de seus adipócitos

(71). Essa expansão está associada à hipóxia, morte celular, inflamação e comprometimento do fluxo de ácidos graxos podendo desencadear alterações metabólicas como resistência à insulina e dislipidemia (72).

A obesidade induz à mudanças no padrão de secreção de adipocinas, que representam o conjunto de citocinas secretadas pelo TA. A leptina é uma adipocina anorexígena que atua no sistema nervoso central suprimindo o apetite e estimulando o gasto energético (73). A adiponectina também atua centralmente influenciando o gasto energético além de reconhecidamente favorecer a sensibilização sistêmica à insulina e possuir efeitos anti-inflamatórios (74). A secreção da leptina aumenta de acordo com o aumento da massa adiposa, entretanto, apesar de elevados níveis da adipocina a obesidade está associada à uma resistência a sua ação. Já a secreção de adiponectina encontra-se reduzida nesta condição. Essa alteração no padrão de secreção de adipocinas visto em obesos sem comprometimento hepático também é encontrado em pacientes portadores da NAFLD (75).

Em resposta às adipocinas e fatores quimiotáticos liberados há infiltração de macrófagos no TA. Os macrófagos podem exibir diferentes fenótipos de acordo com o estímulo que recebem. Macrófagos M1 são conhecidos por secretar um padrão de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-6 e 2, já os macrófagos M2 secretam citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e 12. Adicionalmente ao aumento do número dos macrófagos no TA, a obesidade é associada a mudança do perfil dessas células em direção ao perfil M1 (76). O TNF- α secretado em grandes quantidade pelos macrófagos estimula a lipólise aumentando o fluxo de ácidos graxos na circulação, e consequentemente, no fígado (75). No órgão, esses ácidos graxos são captados através do receptor grupamento de diferenciação (CD36, do inglês *cluster of differentiation*) (77) podendo ser acumulados na forma de triglicerídeos ou ainda serem reconhecidos pelo TLR4, ativando o NF- κ B e perpetuando a resposta inflamatória (78). É digno de nota que ambas as consequências do influxo de ácidos graxos para fígado podem contribuir para a extensão e progressão da NAFLD.

Considerando o volume de tecido adiposo e o seu padrão de secreção de citocinas inflamatórias presentes na obesidade, é prenunciado que a inflamação no tecido, além do efeito local contribua para a inflamação, estresse oxidativo e deposição de gordura hepática (79).

3.2. Tratamento

A mudança no estilo de vida (MEV) que engloba dieta, exercício físico e perda de peso, quando necessário, tem sido defendida como fundamental para o tratamento e prevenção da evolução da NAFLD (Figura 6) (80). Algumas recomendações nutricionais incluem redução do consumo de açúcar, em especial da frutose, além de gordura total, saturada e *trans* (81). Musso e colegas (82) em sua meta análise concluíram que a perda de peso é segura em comparação aos fármacos e ainda contribui para a melhora da histologia hepática e diminuição do risco de doenças cardiovasculares. A perda de pelo menos 3 a 5% do peso corporal já é acompanhada de uma melhora da doença, entretanto, uma perda maior, de 7 a 10%, está associada a melhora histológica da NAFLD. Ademais, a combinação de uma dieta hipocalórica associada a prática de exercícios físicos de moderada intensidade é a melhor opção para a manutenção do peso corporal e, conseqüente, continuidade dos benefícios a longo prazo (43).

O tratamento da NAFLD compreende ainda a identificação e tratamento de outras desordens metabólicas associadas como diabetes e hiperlipidemia e melhora da resistência à insulina através da MEV e/ou farmacoterapia. Ainda, o uso de protetores hepáticos como agentes antioxidantes mostram-se eficazes no controle da doença (83). Nesse sentido, compostos bioativos capazes de modular a ativação de genes e proteínas envolvidos na gênese da esteatose, representam uma atrativa abordagem para a terapia desta condição. Dentre esses compostos pode-se destacar o licopeno, um carotenoide reconhecido por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (84).



Figura 6. Resumo da influência da dieta sobre a progressão da NAFLD. O elevado consumo de açúcares e gorduras visto na dieta ocidental está associado ao comprometimento do metabolismo energético no fígado que leva ao acúmulo intra-hepático de gordura. Mediante a persistência do insulto a doença pode progredir para esteatohepatite, fibrose e hepatocarcinoma. A mudança de estilo de vida não é suficiente para prevenir os estágios avançados da doença.

4. Licopeno

O licopeno é um carotenoide sem atividade provitamina A responsável pela coloração vermelho-alaranjada vista no tomate, melancia, uva, mamão dentre outras frutas e vegetais. Os carotenoides são divididos em dois grupos de acordo com sua composição química. Os carotenoides hidrocarbonetos, como é o caso do licopeno, são compostos por carbono e hidrogênio. As xantofilas, como a luteína, apresentam além do carbono e do hidrogênio o oxigênio (85). O licopeno exibe uma estrutura simétrica e acíclica, contendo 11 duplas ligações conjugadas e 2 ligações não conjugadas (Figura 7). Geometricamente, o licopeno pode apresentar-se na forma *cis* e *trans*, fator influente na sua biodisponibilidade (86).

A capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada ao seu número de duplas ligações conjugadas. Tal relação torna o licopeno um dos antioxidantes mais potentes dentre os carotenoides (87), apresentando especial habilidade em se ligar ao oxigênio *singlet* além de interagir com as EROs, como o H_2O_2 (88). Somado ao caráter antioxidante o licopeno tem se mostrado um

agente anti-inflamatório que contribui para o controle de diversas doenças. O consumo de tomates e seus subprodutos estão associados a limitação do risco de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares. Sendo que os níveis séricos e teciduais de licopeno é inversamente relacionado à incidência dos cânceres de próstata e de mama (89). Para mais, tem-se observado o potencial terapêutico do licopeno no tratamento da NAFLD (84).

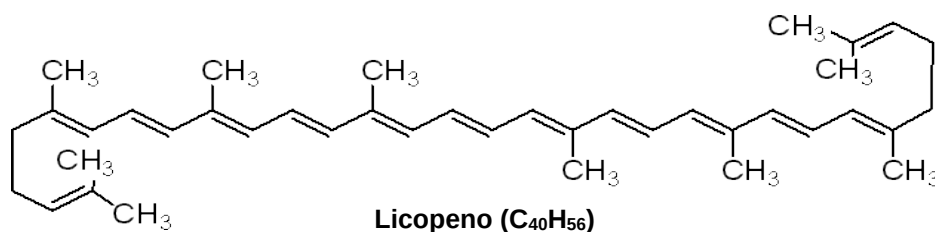


Figura 7. Fórmula estrutural do licopeno.

4.1. Fontes Dietéticas

Os carotenoides estão presentes em organismos fotossintéticos de modo que o organismo humano não é capaz de produzi-los. Assim, devem ser consumidos através da dieta. O tomate apesar de não ser o alimento com maior fonte de licopeno (Tabela 1), caracteriza-se como principal, por ser extensamente consumido (90).

Tabela 1. Principais fontes de licopeno. Adaptado de Rao e Argawal (83).

Fontes Vegetais	Quantidade de Licopeno (µg/g)
Melancia	23 a 72
Goiaba	54
Mamão Papaya	20 a 53
Tomate	8,8 a 42

O conteúdo de licopeno presente nos tomates, como pode ser observado na Tabela 1, sofre variações de acordo com o tipo e o estágio de amadurecimento. Quanto mais maduro e vermelho for o tomate maior será o seu

conteúdo de licopeno (91). Os alimentos à base de tomate também são importantes fontes de licopeno na dieta. O conteúdo do carotenoide de alguns desses produtos pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Conteúdo de licopeno dos principais alimentos à base de tomate. Adaptado de Rao e Argawal (83).

Produtos de Tomate	Quantidade de Licopeno (µg/g)
Tomate fresco	8,8 a 42
Tomate cozido	37
Molho de tomate	62
Sopa de tomate	79
Tomate em pó	1126,3 a 1264,9
Suco de tomate	50 a 116
Ketchup	99 a 134,4

O consumo de licopeno varia de acordo com a população estudada. Considerando os tomates uma fonte significativa de licopeno, é esperado que o licopeno represente a maior proporção de carotenoides consumidos através da dieta entre os italianos, aproximadamente 7,4mg/dia. Isso devido a típica culinária do país. Já a média de ingestão diária na Espanha é de 3,8mg, 4,8mg na França, e no Reino Unido é de 1,1mg (92).

4.2. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade do licopeno é influenciada por vários aspectos incluindo a composição da dieta e o processamento do alimento. O carotenoide é um composto lipossolúvel, por conseguinte, o seu consumo associado a uma fonte de gordura potencializa sua biodisponibilidade. Brown e colegas (93) avaliaram a biodisponibilidade do licopeno e outros carotenoides após a ingestão de salada contendo espinafre, alface, tomate e cenoura acrescida de 0, 6 ou 28g de óleo de canola. Os pesquisadores observaram que a presença de licopeno

nos quilômícrons plasmáticos foi proporcional à quantidade de óleo presente no molho das saladas.

O licopeno derivado de tomates frescos e não processados é pobremente absorvido. A absorção é maior a partir de alimentos processados como molho de tomate aquecido em óleo (94). Isto pois, além de seu caráter lipossolúvel o licopeno está localizado nos cloroplastos ou cromoplastos das células vegetais. O processamento, quer térmico quer mecânico, é capaz de romper a parede celular vegetal tornando o licopeno disponível para ser absorvido (95).

As plantas usualmente apresentam o isômero *trans*-licopeno. Entretanto, as formas *cis*-licopeno são mais facilmente absorvidas pelas células intestinais por serem mais lipossolúveis e, portanto, preferencialmente empacotadas em micelas no momento da absorção. A cocção, ou seja, a exposição à energia térmica, além da exposição à luz e ácidos são responsáveis pela isomerização do licopeno, *trans* para *cis*-licopeno, favorecendo sua absorção (96). Além da isomeria geométrica, outro fator que pode interferir na biodisponibilidade do licopeno de frutas e vegetais *in natura* é a presença de fibras dietéticas. As fibras podem afetar a formação das micelas prejudicando a absorção intestinal do licopeno. Entretanto, esses dados são contraditórios (97).

4.3. Absorção

A absorção intestinal dos carotenoides inclui diversas etapas. Primeiramente, o carotenoide deve ser liberado da matriz alimentar através da ação mecânica do trato digestório e, então emulsificado através dos sais biliares na luz intestinal (92). Durante esse processo é possível que ocorra a isomerização do licopeno, alterando sua configuração *trans* para *cis*-licopeno, isômero encontrado nos tecidos corporais (98). Posteriormente, o licopeno é incorporado às micelas e passivamente captado pelos enterócitos. Esse processo pode ser facilitado através do transportador de membrana de colesterol receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI, do inglês *scavenger receptor class B type I*). No interior dos enterócitos o carotenoide é incorporado aos quilômícrons juntamente com os lipídios dietéticos seguindo o mesmo destino destes, ou seja,

alcançam o sistema linfático e, posteriormente, a circulação sanguínea e tecidos (92, 99).

4.4. Distribuição nos Tecidos

Uma vez absorvido o licopeno é transportado pela corrente sanguínea à diversos órgãos onde pode ser armazenado. Na circulação, o licopeno é transportado através das lipoproteínas. A distribuição do carotenoide entre as diferentes lipoproteínas é variada, sendo que do conteúdo de licopeno consumido 58 a 73% é carreado pela LDL, 17 a 26% pela HDL e 10 a 16% pela VLDL (100). A distribuição do licopeno nos tecidos também é heterogênea o que está relacionado com seus efeitos biológicos em alguns tecidos em detrimento de outros. As maiores concentrações de licopeno são encontradas no fígado, testículos, glândulas adrenais, tecido adiposo e próstata (89). Sendo que o fígado caracteriza-se como principal órgão de depósito de licopeno o que justifica sua ação sobre processos fisiopatológicos relacionados a patologias como a NAFLD (100).

5. Considerações Finais

A obesidade é caracterizada pelo excessivo acúmulo de gordura corporal a ponto de trazer prejuízos à saúde. Uma das consequências de tal condição é o acometimento hepático representado pela NAFLD. A prevalência tanto da obesidade quanto da NAFLD vem crescendo de maneira alarmante na população mundial. Este fato está associado ao estilo de vida atual tipificado pelo consumo exacerbado de alimentos industrializados com destaque para os doces e bebidas açucaradas. Tendo em vista os possíveis desdobramentos da esteatose hepática como a esteatohepatite, cirrose e hepatocarcinoma têm sido extensamente investigado medidas terapêuticas a fim de atenuar/evitar a progressão da doença. Nesse sentido, alguns compostos naturais estão sendo estudados, como o licopeno, um carotenoide cujo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios o tornam um agente terapêutico em potencial para a doença, já que

ambos os processos, oxidativo e inflamatório, contribuem para a gênese da NAFLD.

6. Justificativa

A dieta hipercalórica rica em carboidratos simples está associada a alterações ponderais e metabólicas condizentes com a obesidade e suas comorbidades como a NAFLD. Neste trabalho foi verificado o papel do licopeno sobre tal condição, uma vez que o potencial terapêutico do carotenoide está relacionado à importantes processos vinculados ao desenvolvimento da patologia. Considerando a importância do impacto da NAFLD para a saúde coletiva, bem como o impacto da doença sobre a saúde do indivíduo, este trabalho hipotetiza que o licopeno é capaz de modular processos fisiopatológicos da NAFLD em modelo animal de obesidade induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples.

7. Objetivos

7.1. Objetivo Geral

Verificar o efeito da suplementação com licopeno sobre os processos fisiopatológicos da degeneração gordurosa não alcoólica do fígado induzida por dieta hipercalórica rica em carboidrato simples.

7.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar a presença de obesidade;
2. Caracterizar a presença de esteatose hepática
3. Investigar o impacto da suplementação com licopeno sobre a deposição de gordura no fígado;
4. Verificar a ação do licopeno sobre manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas à obesidade;
5. Verificar o efeito do licopeno sobre o estado pró-inflamatório e oxidativo.

Referências bibliográficas

1. Popkin BM. Nutrition transition and the global diabetes epidemic. *Curr Diab Rep.* 2015;15(9):1-14.
2. Kac G, Pérez-Escamilla R. Nutrition transition and obesity prevention through the life-course. *Int J Obes Suppl.* 2013;3(S1):6–8.
3. DiNicolantonio JJ, Berger A. Added sugars drive nutrient and energy deficit in obesity: A new paradigm. *Open Hear.* 2016;3(2):1–6.
4. Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(7):673–89.
5. World Health Organization. Obesity and Overweight [Internet]. Geneva: WHO; 2018 [citado 18 Jan 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
6. Brasil. Ministério da Saúde. Em dez anos, obesidade cresce 60% no Brasil e colabora para maior prevalência de hipertensão e diabetes. Ministério da Saúde [Internet]. Brasília: MS; 2017 [citado 22 Nov 2018]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28108-em-dez-anos-obesidade-cresce-60-no-brasil-e-colabora-para-maior-prevalencia-de-hipertensao-e-diabetes-no-brasil-e-colabora-para-maior-prevalencia-de-hipertensao-e-diabetes>
7. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes.* 2008;32(9):1431–7.
8. Lu FB, Hu ED, Xu LM, Chen L, Wu JL, Li H, et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;12(5):491–502.
9. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014;384(9945):766–81.
10. Segula D. Complations of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Med J.* 2014;26(1):20–4.
11. Mamtani M, Kulkarni H, Dyer TD, Almasry L, Mahaney MC, Duggirala R, et al. Waist circumference independently associates with the risk of insulin resistance and type 2 diabetes in mexican american families. *PLoS One.* 2013;8(11):1–8.
12. Ighbariya A, Weiss R. Insulin resistance, prediabetes, metabolic syndrome: What should every pediatrician know? *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017;9 Suppl 2:49–57.

13. IDF. International Diabetes Federation. The IDF Concensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome [Internet]. Brussels: IDF; 2006 [citado 20 Mar 2019]. Disponible em: file:///C:/Users/user/Downloads/IDF_Meta_def_final%20(1).pdf.
14. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome Executive Summary. *Circulation*. 2006;112:2735–52.
15. Saklayen MG. The epidemic of the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(12):1–8.
16. Yang KC, Hung HF, Lu CW, Chang HH, Lee LT, Huang KC. Association of non-alcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome independently of central obesity and insulin resistance. *Sci Rep*. 2016;6:1–10.
17. Patell R, Dosi R, Joshi H, Sheth S, Shah P, Jasdanwala S. Non-alcoholic fatty liver disease (nafld) in obesity. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(1):62–6.
18. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*. 2017;9(16):715–32.
19. Abdel-Misih SRZ, Abdel-Misih, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am*. 2014;90(4):643–53.
20. Malarkey, DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicology Patholgy*. 2005; 33:27–34.
21. Bismuth H. A new look on liver anatomy: Needs and means to go beyond the Couinaud scheme. *J Hepatol*. 2014;60(3):480–1.
22. Corless JK, Middleton HM. Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease. *Arch Intern Med*. 1983;143(12):2291–4.
23. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2008.
24. Chen L, Tuo B, Dong H. Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. *Nutrients*. 2016;8(43):1–11.
25. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep*. 2016; 36(6): 1-15.
26. Van Buul VJ, Tappy L, Brouns FJPH. Misconceptions about fructose-containing sugars and their role in the obesity epidemic. *Nutr Res Rev*. 2014;27(1):119–30.
27. Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans-what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab*. 2012;9(89):1–15.

28. DeBosch BJ, Chen Z, Saben JL, Finck BN, Moley KH. Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem*. 2014;289(16):10989–98.
29. Legeza B, Marcolongo P, Gamberucci A, Varga V, Bánhegyi G, Benedetti A, et al. Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Nutrients*. 2017;9(5):1–19.
30. Nguyen P, Leray V, Diez M, Seriser S, Le Bloc'h J, Sillart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol An N*. 2008; 92(3) 272–283.
31. Röhrl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion. *BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(11):1626–33.
32. Jackson AA. Nutrition and liver health. *Dig Dis*. 2017;35(4):411–7.
33. Moschen AR, Tilg H. Nutrition in pathophysiology and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(5):620–5.
34. Perumpail BJ, Khan AM, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(47):8263-8276.
35. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017;37(1):81–4.
36. Wong RJ, Ahmed A. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: Disparate associations among Asian populations. *World J Hepatol*. 2014;6(5):263–73.
37. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int*. 2018;38(1):47–51.
38. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):251–64.
39. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343–51.
40. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2015;65(8):1038–48.
41. Mirmiran P, Amirhamidi Z, Ejtahed H-S, Bahadoran Z, Azizi F. Relationship between diet and non-alcoholic fatty liver disease: a review article. *Iran J Public Health*. 2017;46(8):1007–17.
42. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al.

- The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the american association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–57.
43. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2017;9(9):1–20.
 44. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*. 2013;5(5):1544–60.
 45. Simões ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;95:93–9.
 46. Dunning S, Ur Rehman A, Tiebosch MH, Hannivoort RA, Haijer FW, Woudenberg J, et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2027–34.
 47. Ježek J, Cooper K, Strich R. Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.
 48. Long Q, Yang K, Yang Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis*. 2015;5(1):19–32.
 49. Semchyshyn HM. Reactive carbonyl species in vivo: Generation and dual biological effects. *Sci World J*. 2014;2014:1–10.
 50. Aldini G, Dalle-Donne I, Colombo R, Facino RM, Milzani A, Carini M. Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction. *Chem Med Chem*. 2006;1(10):1045–58.
 51. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739–46.
 52. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Enhancing mitochondrial health to treat hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(10):1–8.
 53. Li J, Romestain C, Han X, Li Y, Hao X, Wu Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab*. 2010;12(2):154–65.
 54. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–14.

55. Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, Nautiyal M, Mathew JT, Martinez J, et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am J Physiol Metab*. 2016;310(7):484–94.
56. Petersen MC, Shulman GI. Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;38(7):649–65.
57. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):3831–40.
58. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(8):469–84.
59. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation. *Br J Nutr*. 2015;114(7):999–1012.
60. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem*. 2016;60(3):275–301.
61. Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203–30.
62. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 2013;20(6):1000–37.
63. Kosaka T, Fukui R, Matsui M, Kurosaka Y, Nishimura H, Tanabe M, et al. RAGE, receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation. *PLoS One*. 2014;9(10):1–13.
64. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. *Rev Bras Reum*. 2008;48(1):17–24.
65. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823–36.
66. Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*. 2016;65(12):2035–44.
67. Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J Hepatol*. 2018;68(2):280–95.
68. Brenner DA, Paik Y-H, Schnabl B. Role of gut microbiota in liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49(1):1–6.
69. Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*. 2012;53(9):2002–13.

70. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol.* 2017;42(2):92–108.
71. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(76):2094–101.
72. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson P-A, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: Hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* 2006;20(9):1540–2.
73. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. The role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med.* 2010;152(2):1–14.
74. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol.* 2016;8(2):101–9.
75. Parker R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Res.* 2018;2(1):35–42.
76. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2011;117(1):175–84.
77. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice. *Endocrinology.* 2016;157(2):570–85.
78. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, et al. Fatty acid-induced induction of toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology.* 2008;126(2):233–45.
79. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol.* 2017;37:35–40.
80. Smolle E, Kessler SM, Golob N, Haybaeck J. Nonalcoholic fatty liver disease. *Genomic Precis Med Prim Care.* 2017;3:283–99.
81. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism.* 2016;65(8):1096–108.
82. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia.* 2012;55(4):885–904.
83. Scherer A, Dufour JF. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J.* 2006;34(1):315–22.
84. Ferramosca A, Di Giacomo M, Zara V. Antioxidant dietary approach in

- treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J Gastroenterol*. 2017;23(23):4146–57.
85. Furr HC, Clark RM. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J Nutr Biochem*. 1997;8(7):364–77.
 86. Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr Res*. 1999;19(2):305–23.
 87. Sles H, Stahl W. Lycopene: Antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Exp Biol Med*. 2013;218(2):121–4.
 88. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24(6):345–51.
 89. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Can Med Assoc J*. 2000;163(6):739–44.
 90. Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*. 2000;54(3):233–6.
 91. Moritz B, Tramonte VLC. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev Nutr*. 2006;19(2):265–73.
 92. Story EN, Kopec RE, Schwartz SJ, Harris GK. An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1:1–24.
 93. Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, et al. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):396–403.
 94. Gärtner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(1):116–22.
 95. Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, et al. A Food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *J Nutr*. 2018;132(3):404–8.
 96. Hof KH van het, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr*. 2000;130(3):503–6.
 97. Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr*. 2004;17(2):227–36.
 98. During A, Harrison EH. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430(1):77–88.
 99. Parker RS. Transport of Carotenoids. *FASEB J*. 1996;10(5):542–51.
 100. Borel P, Landrier J-F, Desmarchelier C. Genetic Polymorphisms

Associated with Blood Concentration of Lycopene. In: Tomatoes and lycopene in human nutrition and health, preventing chronic diseases. CRC Press, 2017. <hal-01603161>; 2017. p. 21–40.

Capítulo II

Artigo Científico

(Apresentado nas normas para submissão à revista *Antioxidants*)

Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats

Mariane Róvero Costa^{1*}, Jéssica Leite Garcia¹, Carol Cristina Vágula de Almeida Silva¹, Artur Junio Togneri Ferron¹, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron¹, Fabiana Kurukawa Hasimoto¹, Cristina Schmitt Gregolin¹, Dijon Henrique Salomé de Campos¹, Cleverton Roberto de Andrade², Ana Lúcia dos Anjos Ferreira¹, Camila Renata Corrêa¹, Fernando Moreto¹

¹São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu 18618-687, Brazil; marianerovero@gmail.com (M.R.C.); jessleitegarcia@gmail.com (J.L.G.); cariolvagula@gmail.com (C.C.V.A.S.); artur.ferron@gmail.com (A.J.T.F.); fabiane_vf@yahoo.com.br (F.V.F.); fkhasimoto@gmail.com (F.K.H.); cristina.s.gregolin@gmail.com (C.S.G.); dijoncampos@gmail.com (D.H.S.C); ferreira@fmb.unesp.br (A.L.A.F.); ccorrea@fmb.unesp.br (C.R.C.); fer_moreto@yahoo.com.br (F.M.).

²São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araraquara 14800-901, Brazil; crevertonroberto72@gmail.com (C.R.A.)

*Correspondence: marianerovero@gmail.com (M.R.C); Tel.: +55-14-3880-1722

Abstract: *Background:* The higher consumption of fat and sugar are associated with obesity development and its related diseases such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Lycopene is an antioxidant which protective potential over fatty liver degeneration has been investigated. The aim of this study was to present therapeutic effects of lycopene on NAFLD related to the obesity induced by hypercaloric diet. *Methods:* Wistar rats were distributed in two groups: control (Co, n=12) and hypercaloric (Ob, n=12). After 20 weeks, the animals were redistributed in control group (Co, n=6), control group supplemented with lycopene (Co+Ly, n=6), obese group (Ob, n=6) and obese group supplemented with lycopene (Ob+Ly, n=6). Ob groups also received water + sucrose (25%). Animals received lycopene solution (10mg/kg/day) or vehicle (corn oil) via gavage for 10 weeks. *Results:* Animals which consumed the hypercaloric diet had higher adiposity index, increased fasting blood glucose, hepatic and blood triglycerides and also presented in the liver macro and microvesicular steatosis, besides elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α). Lycopene has shown therapeutic effects on blood and hepatic lipids, increased high-density lipoprotein cholesterol (HDL), mitigated TNF- α and malondialdehyde (MDA) and further improved the hepatic antioxidant capacity. *Conclusion:* Lycopene shows potential as a therapeutic to NAFLD.

Keywords: lycopene, NAFLD, hypercaloric diet, obesity.

1. Introduction

Obesity is a chronic disease characterized by abnormal or excessive accumulation of body fat, to the extent that health may be impaired [1]. The prevalence of overweight and obesity rises worryingly in developed and developing countries so that obesity represents an overwhelming problem for public health [2]. Recent estimates indicate that more than 1.9 billion adults are overweight and of these more than 650 million are obese [3]. These alarming data are strongly correlated with current dietary and physical activity patterns [4]. Although weight control is a consequence of a complex interaction between genetic, metabolic, psychological and social factors, the obese phenotype is broadly influenced by behavioral aspects [5].

The energy imbalance resulting from the hypercaloric foods consumption and sedentary lifestyle corroborates for such outcome [6]. The higher intake of processed foods containing saturated fat, added sugar and high energy density led to an increase in the caloric value of the diet [7]. Taken together these factors favor the development of obesity and its related diseases such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [8,9].

NAFLD comprises a spectrum of diseases ranging from simple steatosis to biochemical and functional abnormalities in the liver, which may result in an inflammatory process known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH). If this problem is not resolved, it may progress to hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma [9]. It is hypothesized that these liver changes are the result of a two-step process, named as “two hit” theory. The first hit results of the imbalance between hepatic lipid influx and hepatic lipid clearance. The second hit involves the inflammatory and the oxidative process [10,11]. Another hypothesis

attributed to the NAFLD genesis is the "multiple parallel-hit", which comprises several parallel hits including insulin resistance, inflammation, oxidative stress, genetic and epigenetic mechanisms, environmental elements, and microbiota changes [11]. Except for some divergences, these hypotheses present common mechanisms, including oxidative stress and inflammation, which play a central role in the genesis of NAFLD.

Dietary factors are also important to liver fat deposition [10]. The excess of nutrients received by the liver are converted into acetyl-CoA, a common molecule to macronutrients metabolism [12]. Acetyl-CoA can be oxidized through β -oxidation in the mitochondria or participate in the synthesis of triglycerides which can be exported by very low density lipoprotein (VLDL) or also stored in the organ due to saturation of the previous mechanisms [13]. In the presence of large amounts of substrate, the mitochondria increase the production of reactive oxygen species (ROS), impairing its function [14]. ROS are capable of activating inflammatory pathways and the inflammatory cells increase the ROS production, which lead to tissue damage [15]. Moreover, components of the diet itself can directly lead to the activation of inflammatory pathways, such as saturated fatty acids [16], or also lead to intestinal dysbiosis and consequent infiltration of lipopolysaccharides into the bloodstream, contributing to the inflammatory process [17]. Considering this overview and the pathological consequences of NAFLD, it is important to seek effective alternatives to treat or prevent hepatic accumulation of lipid and its unfolding. A wide range of drugs are available for the treatment of NAFLD in order to avoid its progress, including the use of antioxidants, such as lycopene [18].

Lycopene is a carotenoid without provitamin A activity which gives red colors to vegetables such as tomatoes, red grapefruit, watermelon and apricots

[19]. This carotenoid is a powerful antioxidant with anti-inflammatory activity [20] which has been shown to modulate important metabolic processes in the body, attenuating complications of obesity and restoring liver function [19]. Thus, the aim of this study is to verify lycopene therapeutic potential on the pathophysiological processes of NAFLD in obese animals fed a hypercaloric diet.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Protocol

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA protocol number 1266/2018) of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University. The experiment was performed in accordance with the National Institute of Health's Guide to the Care and Use of Laboratory Animals [21]. Male *Wistar* rats were kept in controlled environment of temperature ($22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), luminosity (12h light-dark cycle) and humidity (relative humidity of $60\pm 5\%$). Initially, the animals were distributed in two experimental groups fed different diets for induction of obesity: control diet (n=12) and hypercaloric diet (n=12). At 20th week, after confirmation of difference in body weight and plasma triglycerides, the animals were redistributed in four groups for the lycopene supplementation study: a control group (Co, n=6), a control group supplemented with lycopene (Co+Ly, n=6), an obese group (Ob, n=6) and an obese group supplemented with lycopene (Ob+Ly, n=6). The feed and water were *ad libitum*. The groups received lycopene solution (10mg/kg/day) or vehicle (corn oil) via gavage for 10 weeks.

2.2. Diets

The diets used in this study were previously developed by our research group [22]. Briefly, both diets are nutritionally balanced for micronutrients but different for macronutrients. The control diet is composed by soybean meal, sorghum, soybean peel, dextrin, soybean oil, vitamins and minerals. The hypercaloric diet was designed to mimic the development of obesity associated with western dietary habits, being composed of soybean meal, sorghum, soybean peel, dextrin, sucrose, fructose, lard, vitamins and minerals and addition of 25% sucrose in drinking water. The detailed nutritional composition of both diets is shown in table 1. The diets caloric values are described in item 2.5.

Table 1. Ingredients and nutritional composition of diets.
Adapted from Francisqueti *et al* [22].

Ingredients (g/kg)	Control	Hypercaloric
Soybean meal	335	340
Sorghum	278	80
Soybean peel	188	116
Dextrin	146	20
Sucrose	-	80
Fructose	-	180
Soybean oil	14	-
Lard	-	154
Vitamin and Minerals	25	25
Salt	4	8
Nutricional Composition		
Protein (% of ingredients)	20	18
Carbohydrate (% of ingredients)	60	53.5
Fat (% of ingredients)	4	16.5
% of unsaturated	69	47
% of saturated	31	53
% Energy from protein	22.9	16.6
% Energy from carbohydrate	66.8	49.2
% Energy from fat	10.4	34.2
Energy (kcal/g)	3.59	4.35

The sucrose (25%) added to drinking water is not described in the table.

2.3. Lycopene Supplementation

The lycopene solution used in this study was the tomato oleoresin (Lyc-O-Mato® 6% dewaxed) obtained from LycoRed Natural Products Industries, Israel. The solution was mixed with corn oil, checked for desired concentration absorbance (450nm) and stored in a dark environment to ensure solution stability. The animals received lycopene solution (10mg/kg/day) via gavage for 10 weeks [23,24]. The non-lycopene supplemented groups received corn oil vehicle (1mL) via gavage.

2.4. Euthanasia

At the end of the 30-week period, after 8h of fasting the animals were anesthetized (thiopental 120mg/kg/i.p.) and euthanized by decapitation after the absence of foot reflex to obtain blood, liver and adipose tissues (visceral, retroperitoneal and epididymal). Blood samples were collected in Falcon® tubes containing anticoagulant ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 10 minutes (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) and the plasma was stored in a freezer at -80°C. The liver was fractionated in aliquots, the left hepatic lobe was stored in formaldehyde for histological analysis, and the remaining aliquots were stored in sterile cryotubes in a freezer at -80°C. The fat deposits were dissected for weighing.

2.5. Nutritional and Obesity Characterization

The nutritional characterization was evaluated considering the chow intake, water intake and caloric intake (diet+water). For that, water and chow were measured twice a week. The caloric intake was calculated by multiplying

the daily chow intake by the energy value of each diet using the following formulas:

a. For control diet: caloric intake (kcal/day) = chow intake (g) x energy value of the diet (3.59 kcal/g);

b. For the hypercaloric diet; caloric intake (kcal/day) = [chow intake (g) x energy value of diet (4.35 kcal/g)] + [water intake (mL) x 0.25 x 4 kcal per gram of carbohydrate].

The presence of obesity was established based on weight gain and adiposity index. For that, the body weight was measured weekly. The weight gain was calculated by subtracting the initial weight from the final weight of the animals [weight gain (g) = final weight (g) - initial weight (g)]. The adiposity index represents the ratio of the sum of the epididymal, visceral and retroperitoneal fat deposits by the final weight multiplied by 100 (adiposity index (%) = epididymal (g) + visceral (g) + retroperitoneal (g)/final weight (g) x 100)

2.6. Lycopene Bioavailability Evaluation

The presence of lycopene was determined in plasma and hepatic tissue homogenate. To extract the carotenoids, samples were incubated with internal standard (equinenone), chloroform/methanol CHCl₃/CH₃OH (3mL, 2:1, v/v) and 500mL of saline 8.5 g/L. Then the samples were centrifuged at 3000rpm for 10 minutes and the supernatant was collected and hexane was added. The chloroform and hexane layers were evaporated under nitrogen and the residue was resuspended in 150mL of ethanol and sonicated for 30 seconds. 50µL of this aliquot were injected into the HPLC. The HPLC system (Waters Alliance 2996, Wilmington, MA, USA) programmable photodiode array detector was set at 450 nm for carotenoids. The mobile phase consisted of ethanol/methanol/methyl-tert-

butyl ether/water (83:15:2, v/v/v, 15g/L with ammonium acetate in water, solvent A) and methanol/methyl-*tert*-butyl ether/water (8:90:2, v/v/v, 10g/L with ammonium acetate in water, solvent B). For the quantification of the chromatograms, a comparison was made between the area ratio of the substance and area of the internal standard obtained in the analysis [25].

2.7. Clinical Biochemistry

The glucose determination was performed by glycosimeter (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics Indianapolis, IN, USA). The concentrations of urea, creatinine, uric acid, total proteins, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), triglycerides, total cholesterol and its fractions, high density lipoprotein cholesterol (HDL) and non-HDL cholesterol, were performed by enzymatic colorimetric method with commercial kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brasil) in automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

2.8. Hepatic Tissue Analysis

2.8.1. Histology

Hepatic tissue was stored in 4% paraformaldehyde with 0.1M phosphate buffer (pH=7.4) during the first 24 hours. After, tissue was transferred to 70% ethyl alcohol until paraffin waxing. Histological sections obtained from the paraffin block were layed on slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Later, an experient pathologist analyzed the slides. Macrovesicular steatosis and microvesicular steatosis were both separately scored and the severity was graded based on the percentage of the total area affected. The scores were: 0 (<5), 1 (≥5-33%), 2 (≥33-66%) and 3 (≥66%). The difference between

macrovesicular and microvesicular steatosis was defined by whether the vacuoles displaced the nucleus to the side (macrovesicular) or not (microvesicular) [26]. 10 fields were analyzed per slide per animal. For the statistical analysis it was considered the sum of the scores obtained in the 10 analyzed fields.

2.8.2. Total Proteins

The tissue samples were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) at the ratio of 1:10 (sample:PBS). Total protein concentrations in hepatic tissue were measured in the homogenate by a colorimetric method using the biuret reagent (BioClin, Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and were verified in automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Ltda., Shenzhen, China). The results were used to correct the parameters of inflammation and redox state.

2.8.3. Inflammatory Biomarkers

The hepatic concentrations of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were quantified in the tissue homogenate by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific commercial kits (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA) and a micro-plate reader (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunny Valley, CA, USA). The results were corrected for the total protein present in the tissue and expressed in picogram per milligram of protein (pg/mg protein).

2.8.4. Redox State

2.8.4.1. Oxidative Damage to Lipids

The malondialdehyde (MDA) concentration was obtained by high performance liquid chromatography with fluorometric detection (HPLC, system LC10A, Shimadzu, Japan). The hepatic tissue homogenate (100 μ L) was incubated with thiobarbituric acid (TBA 42mmol/L, 200 μ L) and 1% ortho-phosphoric acid (700 μ L) at 100°C for 60 minutes to form the fluorescent adduct TBA-MDA. Deproteinization was performed with 2mmol/L sodium hydroxide and methanol (NaOH:MetOH; 1:1) submitted to centrifugation (3000rpm, 5 minutes). After 50 μ l of the supernatant was filtered and injected into an octadecylsilic column (ODS-2, 150x4,6mm, 5 μ m; Spherisarb®, Waters). The isocratic mobile phase comprised of the phosphate buffer (10 mmol/L, pH:6.8) and HPLC grade methanol (60:40 v/v), is run through the system at a flow rate of 0.5 mL/min. The calibration curve was obtained with the preparation of tetra-ethoxy propane solutions (TEP). Fluorimetric detection was performed at 527nm of excitation and 551nm of emission. The results were expressed as nanomol per milligram protein (nmol / mg protein) [27].

2.8.4.2. Antioxidant Enzyme Activity

In these analyzes the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was evaluated. Therefore 100mg liver was homogenized (1:20 v/v) in KH₂PO₄ (10mmol/L)/KCl (120mmol/L), pH7.4, and centrifuged at 2.000xg for 20 minutes. SOD activity was measured based on the inhibition of a superoxide radical reaction with pyrogallol, and the absorbance values were measured at 420nm [28]. The values were expressed as units per milligram of protein (U/mg protein). CAT activity was evaluated by following the decrease in the levels of

hydrogen peroxide, absorbance were measured at 240nm [29]. The results are expressed as picomol per milligram of protein (pmol/mg protein).

2.8.4.3. Hepatic Antioxidant Capacity

The hepatic tissue antioxidant capacity was determined by the total antioxidant performance test (TAP) using VICTOR X2 reader (Perkin Elmer-Boston, MA, USA) [30]. This assay utilizes 100µL of homogenate which was incubated with the fluorescent indicator BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene) for 10 minutes at 37°C. Then the free radical generator 2,2'-Azobis(2-amidino-propane)-dihydrochloride (AAPH) was added to the samples. The prepared samples were applied in triplicates (200 µL in each well on specific plates. Phosphatidylcholine (PC) was used as a hydrophilic matrix reference. The fluorescence reader (Wallac Vitor 2X®, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) was programmed to perform readings every 5 minutes for 3 hours and 30 minutes. The analyses were performed in triplicate, and the results represent the percent protection.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as means±standard deviation (SD) or median (interquartile range). Differences among the groups were determined by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test or by Kruskal Wallis test with Tukey *post-hoc* test. The comparison between two groups was performed by the T-test. These statistical analyses were performed using the software Sigma Stat for Windows Version 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). For the histological parameters were used the Poisson distribution or the binomial distribution followed by the *post-hoc* test Wald multi-comparison. These

statistical analyses were performed by experience statistician using the software Statistical Analysis System (SAS) 9.4 (SAS Institute Inc., Campus Drive Cary, NC, USA). A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Nutritional and Obesity Characterization

The nutritional characterization is shown in Figure 1. It is possible to verify that the Ob and Ob+Ly groups presented lower chow intake. There was no difference between the groups in the water and caloric intake.

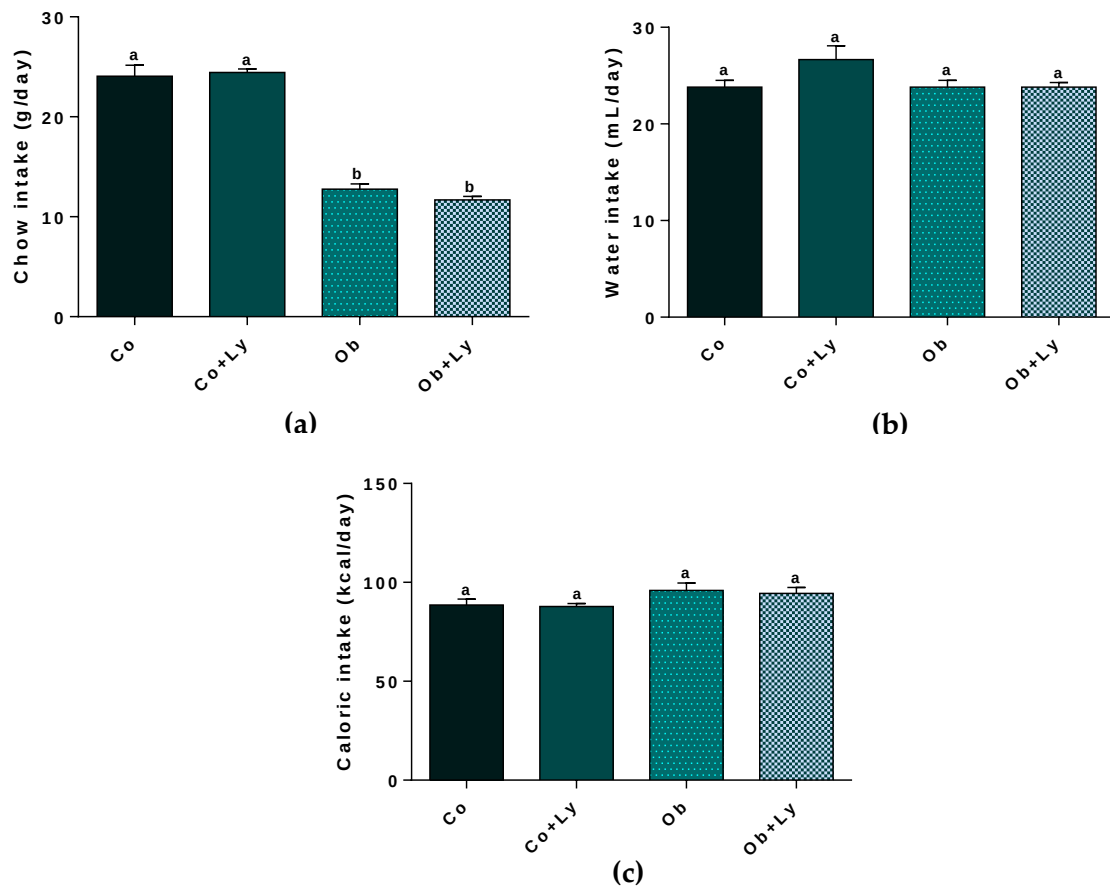


Figure 1. Nutritional characterization: **(a)** chow intake (g/day); **(b)** water intake (mL/day); **(c)** caloric intake (kcal/day). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data expressed in mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p < 0.05$); $n = 6$ animals/group.

The Table 1 shows the weight characteristics of the animals. There was no difference for the initial weight. The obese groups (Ob and Ob+Ly) presented higher final weight and weight gain.

Table 1. Weight Characteristics.

	Co	Co+Ly	Ob	Ob+Ly
Initial Weight (g)	192±28.4 ^a	209±14.3 ^a	212±21.4 ^a	198±11.6 ^a
Final Weight (g)	490±43.7 ^a	470±59.6 ^a	568.5±75.2 ^b	552±42.5 ^b
Weight Gain (g)	297±33.7 ^a	260±52.0 ^a	356±72.9 ^b	354±34.2 ^b

Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean±standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm Sidak *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); n= 6 animals/group..

The determination of the presence of obesity is shown in Figure 2. Similiar to weight gain, the adiposity index was higher in the groups Ob and Ob+Ly.

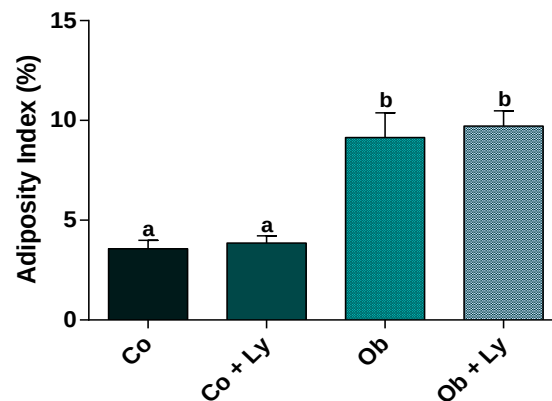


Figure 2. Determination of the presence of obesity: adiposity index (%). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data expressed in mean±standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); n= 6 animals/group.

3.2. Lycopene bioavailability evaluation

The lycopene bioavailability is shown in Table 2. It is possible to verify the presence of lycopene in both groups, which were supplemented (Co+Ly and Ob+Ly).

Table 2. Lycopene bioavailability evaluation.

	Lycopene concentration ($\mu\text{g}/100\text{g}$)			
	Co	Co+Ly	Ob	Ob+Ly
Liver	ND	47.32 $\pm$ 5.95 ^a	ND	25 $\pm$ 2.91 ^b
Plasma	ND	3.18 $\pm$ 0.586 ^a	ND	5.22 $\pm$ 2.31 ^a

Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. ND: not detectable. Data parametric expressed in mean $\pm$ standard deviation. Comparison by t-test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); $n=6$ animals/group.

3.3. Clinical Biochemistry

The table 3 presents the biochemical analysis related to renal and hepatic functions. There was no difference between the groups for all the parameters contented in the table.

Table 3. Biochemical analysis.

	Co	Co+Ly	Ob	Ob+Ly
Urea (mg/dL)	54.2 $\pm$ 8.83 ^a	51.5 $\pm$ 3.95 ^a	48.0 $\pm$ 33.6 ^a	42.8 $\pm$ 20.9 ^a
Creatinine (mg/dL)	0.432 $\pm$ 0.034 ^a	0.433 $\pm$ 0.057 ^a	0.568 $\pm$ 0.291 ^a	0.504 $\pm$ 0.092 ^a
Uric Acid (mg/dL)	0.544 $\pm$ 0.103 ^a	0.693 $\pm$ 0.307 ^a	0.695 $\pm$ 0.122 ^a	0.800 $\pm$ 0.166 ^a
AST (U/L)	149(100-230) ^a	123(113-152) ^a	112(87-213) ^a	141(135-179) ^a
ALT (U/L)	44.5(38.7-161) ^a	50.5(35.5-106) ^a	51(32.7-133) ^a	38.5(32.5-95.7) ^a
Albumin (g/dL)	2.71 $\pm$ 0.062 ^a	2.61 $\pm$ 0.102 ^a	2.70 $\pm$ 0.128 ^a	2.70 $\pm$ 0.105 ^a
Total Proteins (g/dL)	5.68 $\pm$ 0.1485 ^a	5.64 $\pm$ 0.368 ^a	5.92 $\pm$ 0.256 ^a	5.88 $\pm$ 0.333 ^a

Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase. Data parametric expressed in mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm Sidak *post-hoc* test. Data non-parametric expressed in median and interquartile range. Comparison by Kruskal Wallis test with Tukey *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); $n=6$ animals/group.

Markers for lipid and glucose metabolism are exhibited in the Table 3. The fasting blood glucose was higher in the obese groups (Ob and Ob+Ly) independent of lycopene supplementation. Plasma triglycerides was higher only in the Ob group. Similarly, the Ob group presented higher hepatic triglycerides

levels, and the Ob+Ly group showed similar levels to control groups (Co and Co+Ly).

The total cholesterol was higher in the groups supplemented with lycopene. This finding could be influenced by increasing HDL cholesterol levels also observed in supplemented groups, mainly Ob+Ly group. There was no difference between groups for non-HDL cholesterol (Table 3).

Table 4. Markers for lipid and glucose metabolism

	Co	Co+Ly	Ob	Ob+Ly
Fasting Blood Glucose (mg/dL)	74.2±7.56 ^a	91.6±16.6 ^a	102±21.4 ^b	104±7.50 ^b
Triglycerides (mg/dL)	62.0±20.3 ^a	77.3±32.5 ^a	113±41.8 ^b	93.9±12.4 ^a
Hepatic Triglycerides (mg/dL)	20.6±4.29 ^a	20.6±2.92 ^a	33.2±7.99 ^b	29.3±5.59 ^{a,b}
Total Cholesterol (mg/dL)	51.5±8.80 ^a	60.0±12.1 ^{a,b}	56.9±14.1 ^a	71.7±10.8 ^b
HDL Cholesterol (mg/dL)	18.0±3.25 ^a	23.5±3.94 ^b	19.9±5.43 ^a	29.0±2.69 ^c
Non-HDL Cholesterol (mg/dL)	33.5±5.95 ^a	36.4±9.09 ^a	37.0±9.86 ^a	42.6±8.87 ^a

Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean±standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); n= 6 animals/group.

3.4 Histology

The Figure 3 shows the determination of the hepatic steatosis by histological parameters. Independent of lycopene supplementation, the hepatic tissue of the obese animals (Ob and Ob+Ly) presented higher macrovesicular steatosis. Lycopene was efficient in attenuating the microvesicular steatosis of treated obese animals (Ob+Ly).

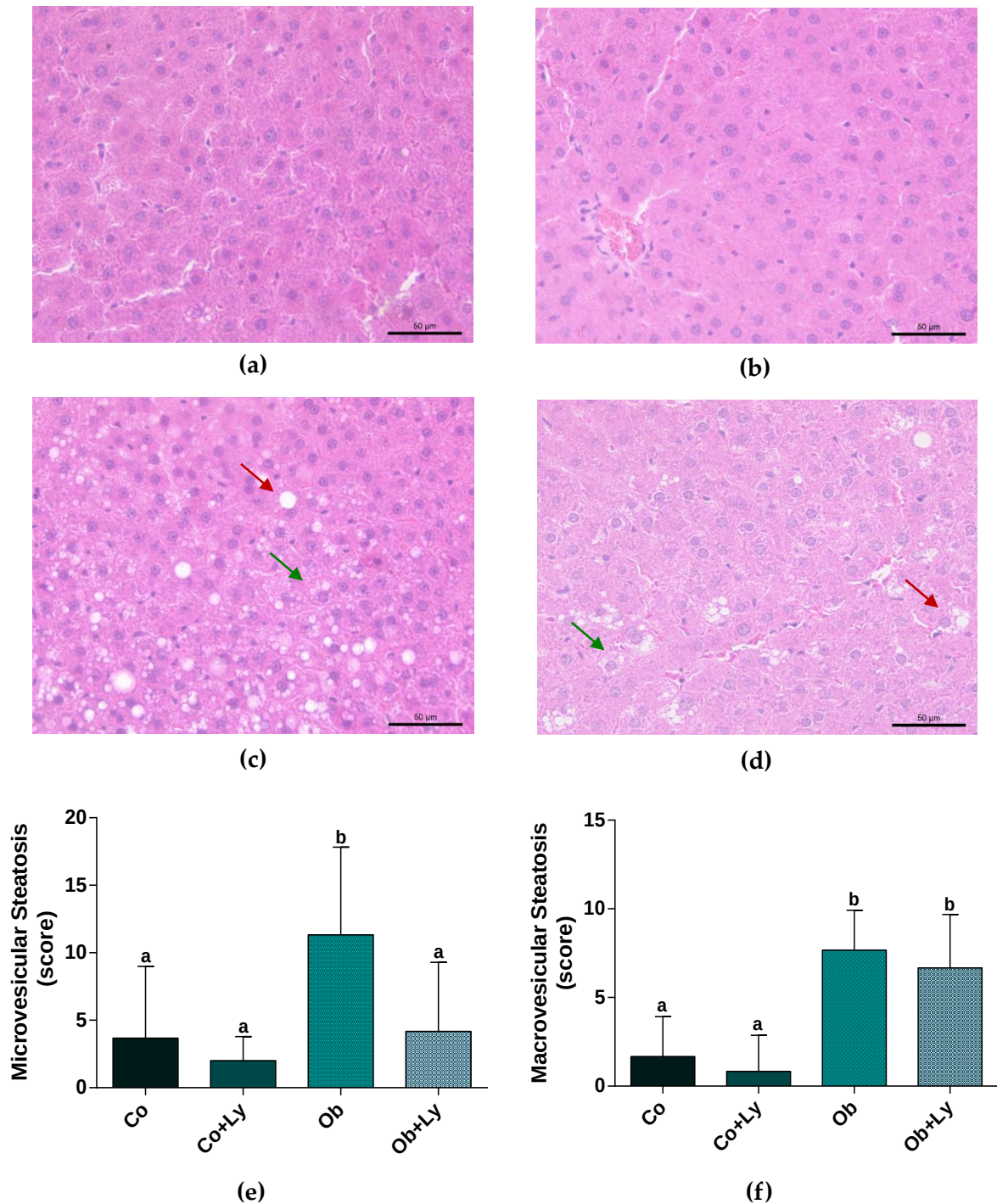


Figure 3. Determination of the hepatic steatosis by hepatic tissue histology stained with H&E: (a) Illustrative picture of the control group (Co); (b) Illustrative picture of the control group supplemented with lycopene group (Co+Ly); (c) Illustrative picture of the obese group (Ob); (d) Illustrative picture of the obese group supplemented lycopene (Ob+Ly); (e) Macrovesicular steatosis (score); (f) Microvesicular steatosis (score). Presence of macro (red arrows) and microvesicular (green arrow) steatosis in obese groups. Data expressed in mean±standard deviation. Comparison by Poisson distribution followed by the *post-hoc* test Wald multi-comparison. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p < 0,05$); $n=6$ animals/group.

3.4 Inflammatory Biomarkers

In hepatic tissue, there was no difference between groups for the pro-inflammatory cytokine IL-6. The Ob group presented the highest levels of TNF- α and the supplementation with lycopene in obese animals (Ob+Ly) was effective in the attenuation this cytokine levels (Figure 4).

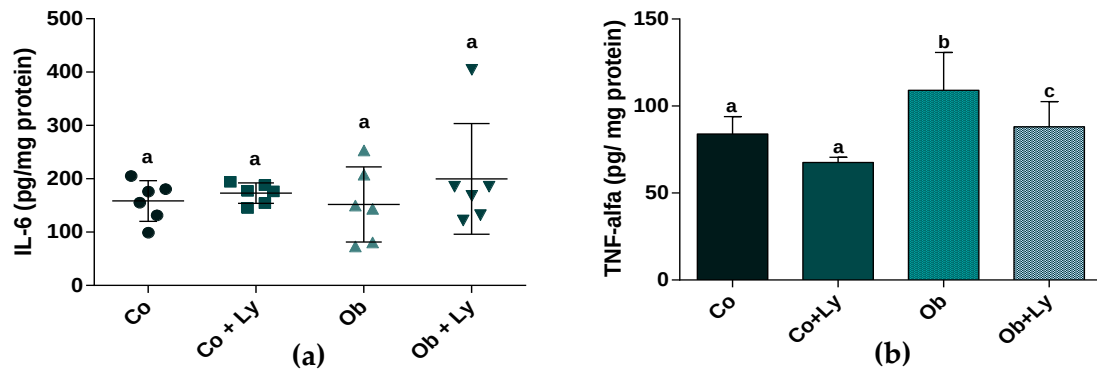


Figure 4. Inflammatory process in hepatic tissue: **(a)** IL-6 (pg/mg protein); **(b)** TNF-alfa (pg/mg protein). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test. Data non-parametric expressed in median and interquartile range. Comparison by Kruskal Wallis test with Tukey *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p < 0,05$); $n = 6$ animals/group. IL-6: interleukin-6; TNF- α : tumor necrosis factor- α .

3.5. Oxidative Damage to Lipids

The lipid peroxidation represented by MDA formation was higher in the control group. Lycopene was effective in diminished oxidative damage to lipids since it is possible to observe the lower levels of MDA in supplemented groups (Co+Ly and Ob+Ly) (Figure 5).

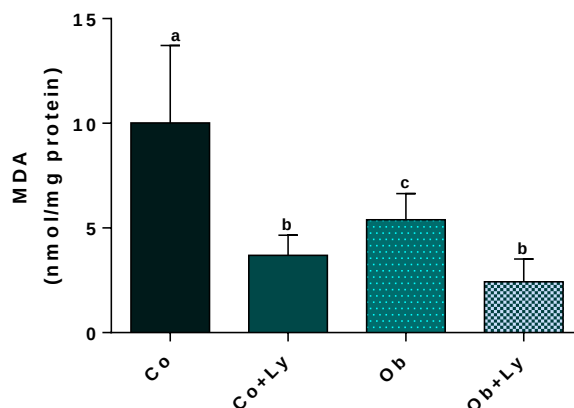


Figure 5. Assessment of lipid peroxidation through the quantification of malondialdehyde (MDA): MDA (nmol/mg protein). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean±standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak post-hoc. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); $n=6$ animals/group

3.6. Antioxidant Enzyme Activity

The figure 6 shows the antioxidant enzyme activity in the liver. It is possible to verify that obese groups (Ob and Ob+Ly) showed reduced activity of CAT and the lycopene supplementation (Ob+Ly) improved CAT activity. The lycopene also had a positive effect on the SOD activity of the Ob+Ly group, which reached similar activity to the control groups (Co and Co+Ly).

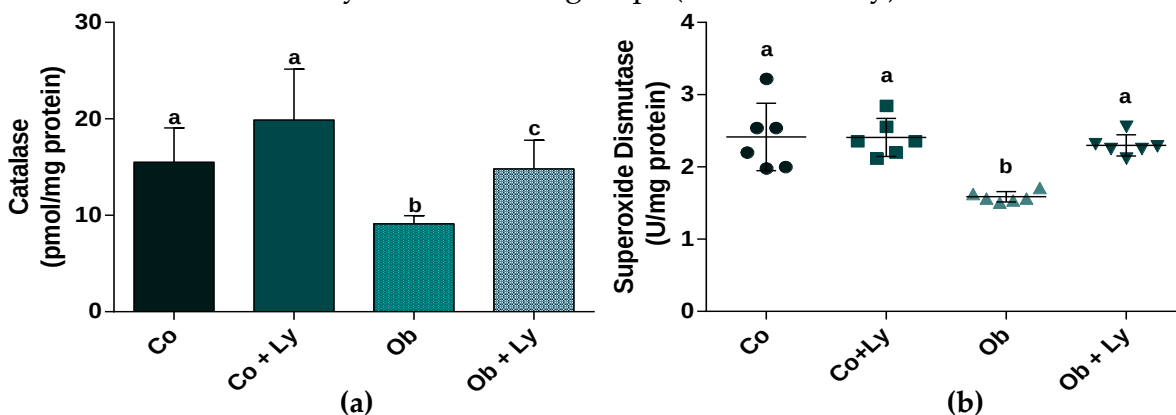


Figure 6: Antioxidant enzyme activity: **(a)** Catalase (pmol/mg protein); **(b)** Superoxide Dismutase (U/mg protein). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean±standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak *post-hoc* test. Data non-parametric expressed in median and interquartile range. Comparison by Kruskal Wallis test with Tukey *post-hoc* test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p<0,05$); $n=6$ animals/group.

3.7. Hepatic Antioxidant Capacity

The figure 7 shows the total hepatic antioxidant capacity. The antioxidant protection was higher in the obese group supplemented with lycopene (Ob+Ly).

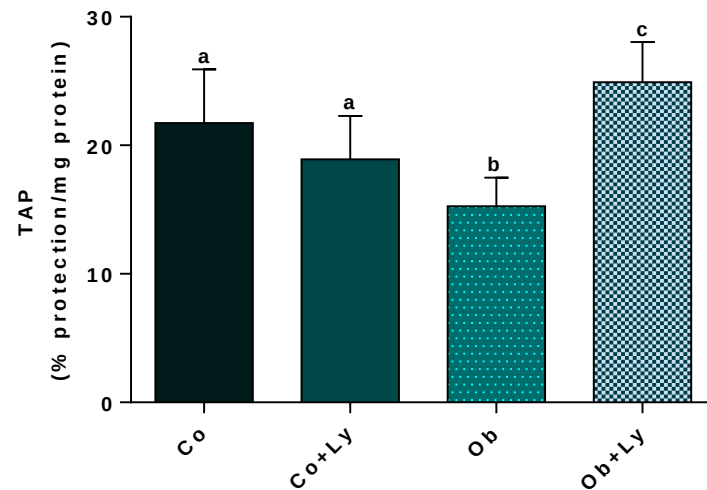


Figure 7. Total antioxidant performance test (TAP) (% protection/mg protein). Co: control group; Co+Ly: control group supplemented with lycopene; Ob: obese group; Ob+Ly: hypercaloric group supplemented with lycopene. Data parametric expressed in mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Holm-Sidak post-hoc. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p < 0,05$); $n = 6$ animals/group

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the therapeutic potential of lycopene on the pathophysiological processes of NAFLD in obese animals fed a hypercaloric diet. The modern lifestyle, emphasizing the consumption of an unbalanced diet rich in sugar and fat, is an important triggering factor for the development of obesity and its related diseases [8], such as NAFLD [31]. Therefore, the induction of obesity through a hypercaloric diet mimics the habits of the population and reproduces the liver changes observed in the pathology [32]. Lycopene is a carotenoid known for its antioxidant activity, which contributes to the control of the redox state in the liver. Additionally, in this study

lycopene also exhibited an anti-inflammatory property, and regulated blood and hepatic lipid metabolism.

The experimental model proposed in this study, promoted metabolic and hepatic changes, represented by increased levels of fasting blood glucose and of plasmatic and hepatic triglycerides both associated with the accumulation of fat in the liver. This hepatic disturbance could be observed in the histological analysis through macro and microvesicular steatosis. However, there were no changes in liver enzymes ALT and AST evidencing that there was no progression of the disease. Although the model did not transpose steatosis, the obese animals (Ob) presented high levels of TNF- α levels, a potent pro-inflammatory cytokine. It is also observed a greater weight gain and a different body composition represented by the adiposity index. The animals, which fed a hypercaloric diet, ate a smaller amount of chow in grams. This event did not interfere the caloric intake value as these animals received a higher caloric amount derived from water intake containing 25% sucrose. Despite the similar caloric intake between the groups, the difference in diet composition, in other words, its macronutrient quality and distribution reflected a greater weight gain in the groups, which received the hypercaloric diet, in addition to all metabolic changes remarked.

The diet led to changes in lipid metabolism by contains a high supply of simple carbohydrates included fructose and sucrose, the latter a disaccharide composed of fructose and glucose. Fructose is absorbed by the enterocytes, reaches the systemic circulation being widely absorbed by the liver. In the organ, the monosaccharide is metabolized following different pathways and generating metabolites such as glucose, lactate, free fatty acids and triglycerides *via de novo* lipogenesis. The latter can be packed with apolipoprotein B100 (ApoB100) in the VLDL and exported [33]. Regardless of the metabolic fate, the fructose

catabolism begins with the phosphorylation reaction catalyzed by fructokinase (KHK). Unlike glucose metabolism, in which a feedback mechanism regulates phosphofructokinase activity for the production of pyruvate and hence acetyl-CoA and fatty acids, the main fructose-metabolizing enzyme, KHK, is poorly regulated [34]. Thereby is understandable the sensitivity of plasma triglyceride concentration to changes in diet composition since the high consumption of fructose is associated with hyperlipidemia, as well to others deleterious consequences as NAFLD [34]. Additionally, it should be noted that the diet is still rich in lard which contributes to higher plasma and hepatic triglyceride levels [35]. All these changes lead to ROS overproduction and inflammatory cytokine release in liver, factors associated with the severity and progression of the disease.

Supplementation with lycopene did not influence the chow intake behavior and the weight gain of the treated groups. Although several studies have listed lycopene as an inducer of adiponectin concentrations [23, 36] an adipokine which serum levels are negatively associated with obesity by increasing energy expenditure [37], few have signed lycopene as a subsidiary in weight control [36]. The lycopene also did not influence the fasting blood glucose, although the action of lycopene in glycemic control of diabetic animals was found in the literature [38, 39].

Lycopene is absorbed in the intestine and stored in addition to other organs in the liver where it exerts its biological activities [40]. So the lycopene acts as a protective factor in the organ due to its antioxidant effect [41]. However, although redox imbalance state plays an important role in the pathogenesis of NAFLD, other metabolic disturbances are important as changes in energy metabolism [40]. Accordingly, the positive effects of lycopene were not only

restricted to the protective effect in the antioxidant hepatic system, discussed later, since that one of the most relevant effects of lycopene supplementation was its action on lipid metabolism.

The liver is responsible for several functions in the body, such as cholesterol, fatty acids, carbohydrates and protein metabolism, besides the formation of plasma proteins, production of bile among other processes [42]. Some members of the nuclear receptor (NR) family are responsible for regulating these mechanisms in order to maintain the hepatic and body homeostasis. NRs respond to natural and synthetic binders such as lipids, vitamins, drugs and others [43]. One of the mechanisms, which may be related to the lycopene effects, is its ability to interact with NR such as the liver X receptor (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) [44]. These receptors form heterodimers with the retinoid X receptor (RXR), resulting in gene transcription [45]. The heterodimers may be activated by specific ligands for each component of the pair or by simultaneous binding. Lycopene seems acts as a RXR ligand and is therefore capable of activating several NRs, although it has an important affinity for PPARs family [44]. Anyway, these receptors are highly expressed in the liver and are involved in the transcription of enzymes related to lipid metabolism.

There are three isoforms of PPAR: PPAR- α , PPAR- β and PPAR- γ . Although all have important metabolic functions the PPAR- α is identified as the master regulator of hepatic lipid metabolism [46]. PPAR- α is expressed in tissues which use fatty acids as energy source and, therefore, have high rates of β -oxidation being widely expressed in the liver [47]. Its expression is inversely proportional to the progression of the histological severity of NAFLD and directly proportional to the improvement of the inflammatory state [48]. PPAR- α plays a key role in lipid catabolism through regulating target genes involved

in β -oxidation, uptake and activation of fatty acids and lipolysis [49]. Thus, PPAR- α has been targeted in the development of drugs for the NAFLD treatment [50], and lycopene was shown to have a protective effect on the disease through its binding in these NR [51].

Histologically, the NAFLD is characterized by macrovesicular steatosis, that is, large or small lipid droplets present in the cytoplasm with nucleus displacement [52]. However, approximately 10% of the liver biopsies of patients with NAFLD present microvesicular steatosis [53] which is characterized by the accumulation of innumerable lipid droplets with centrally placed nucleus [54]. The extensive microvesicular steatosis is associated with alcoholic fatty liver disease [55]. The difference between macrovesicular and microvesicular steatosis is not restricted to the histological aspect. Macrovesicular steatosis when alone is associated with a good prognosis with rare progression to fibrosis or cirrhosis [53]. Contrary, the microvesicular steatosis is a serious condition related to fibrosis, cholestasis, necrosis [56] and moreover to an impairment of the mitochondrial fatty acid oxidation [57]. The details surrounding the formation of these lipid droplets remain to be defined [58] and this study is not able to discern the relationship between micro and macrovesicular steatosis.

Interestingly, in the present study lycopene was able to reduce microvesicular steatosis. This effect could be attributed to enhanced β -oxidation, an impaired pathway in this pattern of lipid accumulation [57]. Gala Martín-Pozuelo and colleagues [59] followed for 7 weeks 24 Sprague-Dawley rats fed a hypercaloric diet and provided with water or tomato juice. The researchers concluded that the lycopene increased the activity of some enzymes involved in β -oxidation in the liver of animals that received the juice. This event was attributed to the activation of PPAR- α by lycopene.

Several researches with animal models have investigated the therapeutic effect of lycopene on blood lipids. Supplementation of lycopene with doses ranging from 4 to 12mg/kg/day for up to 16 weeks in rabbits [60-62] and rats [63] was associated with a decrease in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol (LDL) levels and increased HDL. Maintaining adequate levels of cholesterol is vitally important, and it is possible through a perfect balance between synthesis, absorption, metabolism and elimination of cholesterol [64]. In this study, an increase in total cholesterol was observed in the groups supplemented with lycopene. Such a finding may be justified by the higher levels of HDL in these animals, since there was no change in non-HDL levels. HDL is the lipoprotein responsible for the reverse transport of cholesterol by removing cholesterol from the peripheral vessels and directing it to the liver. This added to other properties such as antioxidative, anti-inflammatory, vasodilatory, antithrombotic and cytoprotective make HDL a protective factor for cardiovascular diseases intrinsically associated with obesity [65]. In this sense, pharmacological and dietary therapies have been investigated with the objective of elevating HDL [66]. This lipoprotein beyond cholesterol is responsible for the transport of other molecules, including proteins, small RNAs, bioactive lipids, hormones, vitamins and carotenoids. Hence, it has been suggested that the content of carotenoides plays a role in protecting HDL from oxidative modification [67].

The increase of adipose tissue observed in obesity is characterized by a state of low-grade chronic inflammation, due to the pattern of inflammatory proteins release by the tissue. Serum amyloid A (SAA) is one of these pro-inflammatory proteins which in high concentrations displaces apoprotein AI (apoA-I) as the predominantly apolipoprotein of HDL making the lipoprotein

dysfunctional [68]. McEneny and colleagues [69] studied the effects of lycopene on HDL and SAA in moderately overweight middle-aged men and women. Lycopene intervention diminished inflammation by decreasing systemic levels of SAA hence reducing the association of SAA with HDL, and even positively influenced the structural and/or functional composition of the apo AI. In this way, the carotenoid helped to restore the HDL functions. Also, HDL is produced in the liver and intestine and its formation is controlled by NR [70]. PPAR- α is able to increase the synthesis of apoAI and the ATP-binding cassette A1 transporter (ABCA1) expression. In the intestine, activation of PPAR- α is facilitated by the binding of agonists present in the diet, such as lycopene. The action of lycopene in both the liver and the intestine results in an increased plasma HDL levels [71]. To further the LXR agonism of lycopene also seems to increase expression of ABCA1 and hence increase HDL levels[72].

The inflammation and oxidative stress are two relevant features of NAFLD. The liver inflammatory process represents an important pathway in the development of NAFLD/NASH, therefore, researches has sought its control [73]. The hypercaloric diet increases the hepatic levels of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , probably through activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling [74]. It is established in literature the anti-inflammatory potential of lycopene by promoting a significant inhibition of the NF- κ B probably mediate by PPARs [75]. In the present study lycopene reduced the levels of TNF- α reflecting a control of the pro-inflammatory mechanisms and also contributing to reduction pattern and extent of liver damage [76]. The inflammatory response may promote the ROS production by the immune system cells, which contributes to liver damage [77]. Furthermore ROS are able to activate NF- κ B to induce pro-

inflammatory cytokines contributing to this vicious cycle between inflammation and oxidative stress [14].

The accumulation of hepatic lipid related to a hypercaloric diet induces a metabolic shift in order to overcome this amount of lipid. This shift includes improvements in β -oxidation, Krebs cycle and stimulation of oxidative phosphorylation (OXPHOS) [78]. However, with the chronic overnutrition the mitochondrial adaptation is insufficient leading to the ROS overproduction [14]. One of the consequences of the redox unbalance is the lipid lipoperoxidation represented here by the formation of MDA. The MDA levels were higher in the control groups due to the lipid source of diet since the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) present in soybean oil are more susceptible to lipid peroxidation [79]. Nevertheless, lycopene supplementation elevated SOD and CAT activity and significantly decreased the MDA level in hepatic tissue, probably due to nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation. The Nrf2 system plays a crucial role in the regulation of redox homeostasis by orchestrating the antioxidant defense mechanisms by inducing endogenous antioxidant enzymes [80]. In addition, lycopene was efficient in increasing total antioxidant capacity in the obese group supplemented with lycopene (Ob+Ly), contributing to the control of pro-oxidative and pro-inflammatory processes.

In summary, lycopene decreases plasmatic and hepatic triglycerides levels, increased HDL-c, mitigates microvesicular steatosis, attenuate levels of TNF- α and contributes to the redox balance in the liver. In view of these results, it may be concluded that lycopene modulates important pathophysiological processes of the NAFLD, being a therapeutic potential for the disease control.

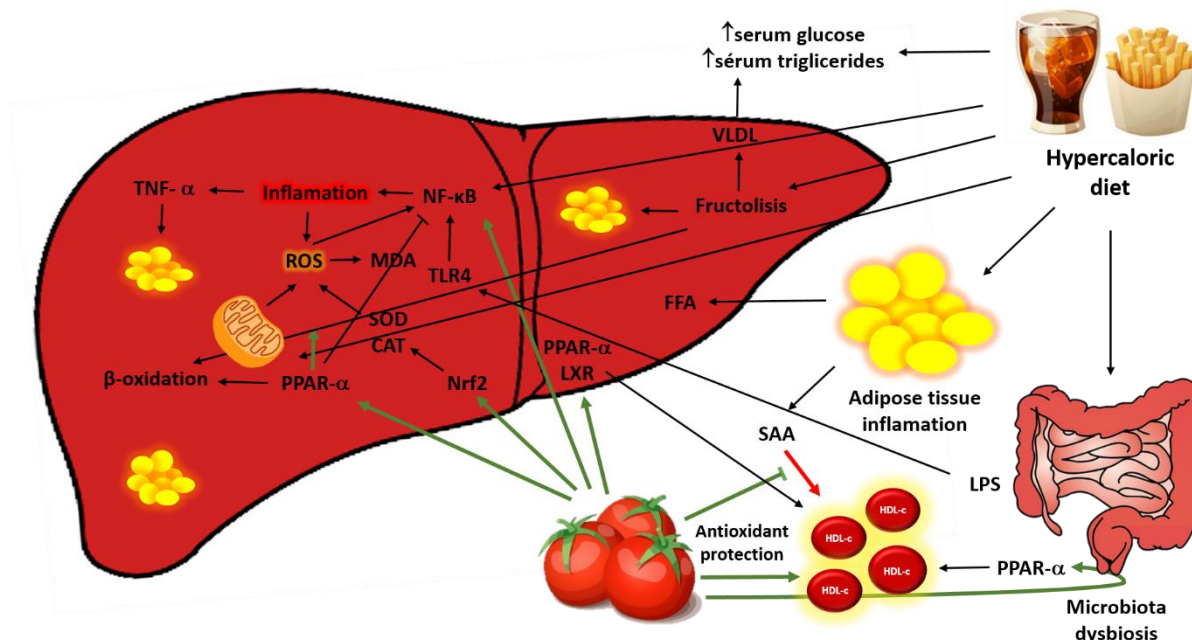


Figure 6. Role of lycopene in the pathophysiological process of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The hypercaloric diet provides large amounts of fat and especially sugars which saturate the liver's ability to export triglycerides leading to its accumulation in the hepatocyte in addition to increased levels of triglyceride and plasma glucose. These macronutrients also activate inflammatory pathways directly by NF- κ B activation and indirectly through alteration of intestinal permeability and translocation of LPS to the liver. The excess nutrients overload the oxidation capacity of mitochondria leading to ROS production, establishing a mutually dependent process between inflammation and oxidative stress. Lycopene was efficient in controlling the inflammatory and oxidative pathways, as well as in the antioxidant activity and assisted in the control of the accumulation of hepatic lipids, activating β -oxidation. Furthermore, the carotenoid improved blood lipids profile by lowering triglycerides and increasing HDL-C levels. LPS: lipopolysaccharides; SAA: Serum amyloid A; HDL-c: high density lipoprotein cholesterol; VLDL: very low density lipoprotein, FFA: free fatty acid; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PPAR- α : peroxisome proliferator-activated receptor α ; SOD: superoxide dismutase CAT: catalase; TLR4: toll-like receptor 4; ROS: reactive oxygen species; MDA: malondialdehyde; TNF- α : tumor necrosis factor- α .

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 42.42.09/2016-0).

Author contributions: Conceptualization, F.M., C.R.C. and A.L.A.F.; methodology, J.L.G., A.J.T.F, F.V.F, F.K.H., D.H.S.C. and M.R.C.; data analysis, M.R.C., C.R.A.; writing—original draft preparation, M.R.C., C.S.G. and C.C.V.A.S.; writing—review and editing, M.R.C., J.L.G., C.R.C., F.M.; supervision, M.R.C. and F.M.; funding acquisition, A.L.A.F.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series 894: Geneva, 2000.
2. Kelly, T.; Yang, W.; Chen, C. S.; Reynolds, K.; He, J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* **2008**, *32*, 1431–1437.
3. World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Obesity and Overweight (accessed Dec 7, 2018).
4. Popkin, B. M. Nutrition transition and the global diabetes epidemic. *Curr. Diab. Rep.* **2015**, *15*, 1617–1622.
5. Mehrabani, J.; Ganjifar, Z. K. Overweight and obesity: a brief challenge on prevalence, complications and physical activity among men and women. *Women's Heal.* **2018**, *7*, 19–24.
6. DiNicolantonio, J. J.; Berger, A. Added sugars drive nutrient and energy deficit in obesity: A new paradigm. *Open Hear.* **2016**, *3*, 1–6.
7. Fleur, S.E.; Luijendijk, M.C.M.; van Rozen, A.J.; Kalsbeek, A.; Adan, R.A.H. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int. J. Obes.* **2010**, *35*, 595–604.
8. Segula, D. Complications of obesity in adults: a short review of the literature. *Malawi Med. J.* **2014**, *26*, 20–24.
9. Lu, F. Bin; Hu, E. De; Xu, L. M.; Chen, L.; Wu, J. L.; Li, H.; Chen, D. Z.; Chen, Y. P. The Relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver

- disease: Systematic review and meta-analysis. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *12*, 491–502.
10. Lim, J. S.; Mietus-Snyder, M.; Valente, A.; Schwarz, J. M.; Lustig, R. H. The Role of fructose in the pathogenesis of naflcd and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 251–264.
 11. Ni, Y.; Zhuge, F.; Nagashimada, M.; Ota, T. Novel action of carotenoids on non-alcoholic fatty liver disease: macrophage polarization and liver homeostasis. *Nutrients* **2016**, *8*, 1–16.
 12. Shi, L.; Tu, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: Mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *33*, 125–131.
 13. Kim, C. W.; Addy, C.; Kusunoki, J.; Anderson, N. N.; Deja, S.; Fu, X.; Burgess, S. C.; Li, C.; Chakravarthy, M.; Previs, S.; et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: A bedside to bench investigation. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 394–406.
 14. Simões, I. C. M.; Fontes, A.; Pinton, P.; Zischka, H.; Wieckowski, M. R. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *95*, 93–99.
 15. Nita, M.; Grzybowski, A. The Role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–23.
 16. Fritsche, K. L. The science of fatty acids and inflammation. *Adv. Nutr* **2015**, *6*, 293–301.
 17. Lau, E.; Carvalho, D.; Freitas, P. Gut microbiota: Association with NAFLD and metabolic disturbances. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–9.
 18. Sumida, Y.; Yoneda, M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 362–376.
 19. Ferramosca, A.; Di Giacomo, M.; Zara, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 4146–4157.
 20. Kawata, A.; Murakami, Y.; Suzuki, S.; Fujisawa, S. Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-*n*-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. *In Vivo* **2018**, *32*, 255–264.
 21. Canadian Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. CCAC. 1993, *1*, 209.
 22. Francisqueti, F. V.; Minatel, I. O.; Ferron, A. J. T.; Bazan, S. G. Z.; Silva, V. S. S.; Garcia, J. L.; Campos, D. H. S.; Ferreira, A. L.; Moreto, F.; Cicogna, A. C.; et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients* **2017**, *9*, 1–10.
 23. Luvizotto, R. A. M.; Nascimento, A. F.; Miranda, N. C. M.; Wang, X. D.; Ferreira, A. L. A. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose

- tissue of obese Rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **2015**, *34*, 612–619.
24. Luvizotto, R. D. A. M.; Nascimento, A. F.; Imaizumi, E.; Pierine, D. T.; Conde, S. J.; Correa, C. R.; Yeum, K. J.; Ferreira, A. L. A. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 1803–1809.
 25. Ferreira, A.L.A.; Salvadori, D.M.F.; Munhoz, Nascimento, M.C.M.O.; Rocha N.S.; Correa, C.R.; Pereira, E.J.; Matsubara, L.S.; Matsubara, B.B.; Ladeira, M.S.P.L. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat Res.* **2007**, *631*, 26–35.
 26. Liang, W.; Menke, A. L.; Driessen, A.; Koek, G. H.; Lindeman, J. H.; Stoop, R.; Havekes, L. M.; Kleemann, R.; Van Den Hoek, A. M. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–17.
 27. Moreto, F.; de Oliveira, E. P.; Manda, R. M.; Burini, R. C. The higher plasma malondialdehyde concentrations are determined by metabolic syndrome-related glucolipotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 1–7.
 28. Marklund, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett.* **1985**, *184*, 237–239.
 29. Aebi, H. Oxygen Radicals in Biological Systems: Preface. *Methods Enzymol.* **1990**, *186* (1947), 121–126.
 30. Beretta, G.; Aldini, G.; Facino, R.M.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I.; Yeum, K.J. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem.* **2006**, *354*, 290–8
 31. Yang, C. Q.; Shu, L.; Wang, S.; Wang, J. J.; Zhou, Y.; Xuan, Y. J.; Wang, S. F. Dietary patterns modulate the risk of non-alcoholic fatty liver disease in chinese adults. *Nutrients* **2015**, *7*, 4778–4791.
 32. Rodrigues, A. A.; Andrade, R. S. B.; Vasconcelos, D. F. P. Relationship between experimental diet in rats and nonalcoholic hepatic disease: Review of literature. *Int. J. Hepatol.* **2018**, 1–8.
 33. Zhang, D. M.; Jiao, R.Q.; Kong, L. D. High dietary fructose: direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients* **2017**, *9*, 1–25.
 34. Legeza, B.; Marcolongo, P.; Gamberucci, A.; Varga, V.; Bánhegyi, G.; Benedetti, A.; Odermatt, A. Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Nutrients* **2017**, *9*, 1–19.
 35. Viggiano, E.; Mollica, M. P.; Lionetti, L.; Cavaliere, G.; Trinchese, G.; Filippo, C. De; Chieffi, S.; Gaita, M.; Barletta, A.; Luca, B. De; et al. Effects of an high-fat diet enriched in lard or in fish oil on the hypothalamic amp-activated protein kinase and inflammatory mediators. *Front. Cell. Neurosci.* **2016**, *10*, 1–8.
 36. Li, Y.-F.; B.S., Y.-Y. C.; Huang, H.-C.; M.S., Y.-C. W.; Yang, M.-D.; Chao, P.-M. Tomato juice supplementation in young women reduces inflammatory adipokine levels independently of body fat reduction. *Nutrition* **2014**, *31*, 691–

- 696.
37. Liu, M.; Liu, F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem. J.* **2009**, *425*, 41–52.
 38. Soleymaninejad, M.; Joursaraei, S. G.; Feizi, F.; Jafari Anarkooli, I. The effects of lycopene and insulin on histological changes and the expression level of Bcl-2 family genes in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 1–9.
 39. Aydin, M.; Çelik, S. Effects of lycopene on plasma glucose, insulin levels, oxidative stress, and body weights of streptozotocin-induced diabetic rats. *Turkish J. Med. Sci.* **2012**, *42*, 1406–1413.
 40. Bernal, C.; Martín-Pozuelo, G.; Lozano, A. B.; Sevilla, Á.; García-Alonso, J.; Canovas, M.; Periago, M. J. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1870–1881.
 41. Yilmaz, B.; Sahin, K.; Bilen, H.; Bahcecioglu, I. H.; Bilir, B.; Ashraf, S.; Halazun, K. J.; Kucuk, O. Carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **2015**, *4*, 161–171.
 42. Corless, J. K.; Middleton, H. M. Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease. *Arch. Intern. Med.* **1983**, *143*, 2291–2294.
 43. Sladek, F. M. What Are Nuclear Receptor Ligands? *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *334*, 3–13.
 44. Caris-Veyrat, C.; Garcia, A. L.; Reynaud, E.; Lucas, R.; Aydemir, G.; Rühl, R. A review about lycopene-induced nuclear hormone receptor signalling in inflammation and lipid metabolism via still unknown endogenous Apo-10'-lycopenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2016**, *86*, 62–70.
 45. Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear receptors, RXR & the big bang. *Cell* **2014**, *157*, 255–266.
 46. Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* **2004**, *20*, 649–688.
 47. López-Velázquez, J. A.; Carrillo-Córdova, L. D.; Chávez-Tapia, N. C.; Uribe, M.; Méndez-Sánchez, N. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2016**, *1859*, 1083–1099.
 48. Prawitt, J.; Caron, S.; Van Hul, W.; Lefebvre, P.; Verrijken, A.; Van Gaal, L.; Michielsen, P.; Hubens, G.; Mertens, I.; Taskinen, M. R.; et al. PPARα gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 164–173.
 49. Rakhshandehroo, M.; Knoch, B.; Müller, M.; Kersten, S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* **2010**, *2010*, 1–20.
 50. Pappachan, J. M.; Babu, S.; Krishnan, B.; Ravindran, N. C. Non-alcoholic fatty liver disease: a clinical update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2017**, *5*, 384–393.
 51. Jiang, W.; Guo, M. H.; Hai, X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J. Gastroenterol.* **2016**,

- 22, 10180–10188.
52. Brunt, E. M.; Tiniakos, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 5286–5296.
 53. Tandra, S.; Yeh, M. M.; Brunt, E. M.; Vuppalanchi, R.; Cummings, O. W.; Ünalp-Arida, A.; Wilson, L. A.; Chalasani, N. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2010**, *55*, 654–659.
 54. Benedict, M.; Zhang, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J. Hepatol.* **2017**, *9*, 715–732.
 55. Seitz, H. K.; Bataller, R.; Cortez-Pinto, H.; Gao, B.; Gual, A.; Lackner, C.; Mathurin, P.; Mueller, S.; Szabo, G.; Tsukamoto, H. Alcoholic Liver Disease. *Nat. Rev.* **2018**, *4*, 109–120.
 56. Fromenty, B.; Pessayre, D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. *J. Hepatol.* **1997**, *26*, 43–53.
 57. Fromenty, B.; Berson, A.; Pessayre, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: Role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J. Hepatol.* **2005**, *26*, 13–22.
 58. Mashek, D. G.; Khan, S. A.; Sathyanarayan, A.; Ploeger, J. M.; Franklin, M. P. Hepatic Lipid droplet biology: Getting to the root of fatty liver. *Hepatology* **2015**, *62*, 964–967.
 59. Martín-Pozuelo, G.; Santaella, M.; Hidalgo, N.; García-Alonso, J.; Periago, M. J.; Navarro-González, I.; Ros, G.; González-Barrio, R.; Gómez-Gallego, C. The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *54*, 933–944.
 60. Hu, M. Y.; Li, Y.-L.; Jiang, C. H.; Liu, Z. Q.; Qu, S. L.; Huang, Y. M. Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition* **2008**, *24*, 1030–1038.
 61. Lorenz, M.; Fechner, M.; Kalkowski, J.; Fröhlich, K.; Trautmann, A.; Böhm, V.; Liebisch, G.; Lehneis, S.; Schmitz, G.; Ludwig, A.; et al. Effects of lycopene on the initial state of atherosclerosis in new zealand white (NZW) rabbits. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–8.
 62. Mulkalwar, S. A.; Munjal, N. S.; More, U. K.; More, B.; Chaudhari, A. B.; Dewda, P. R. Effect of purified lycopene on lipid profile, antioxidant enzyme and blood glucose in hyperlipidemic rabbits. *Am. J. Pharm. Tech. Res.* **2012**, *2*, 460–470.
 63. Hassan, H. A.; Edrees, G. M. Therapeutic effect of lycopene-rich tomato juice on cardiac disorder in rats fed on fried food in oxidized frying oil. *Egypt. J. Hosp. Med.* **2004**, *14*, 115–126.
 64. Sato, R. Functions of cholesterol metabolites. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2015**, *61*, 151–153.
 65. Kosmas, C. E.; Martinez, I.; Sourlas, A.; Bouza, K. V.; Campos, F. N.; Torres, V.; Montan, P. D.; Guzman, E. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its

- relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context*. **2018**, 7, 1–9.
66. Farrer, S. Beyond statins: Emerging evidence for hdl-increasing therapies and diet in treating cardiovascular disease. *Adv. Prev. Med.* **2018**, 2018, 1–9.
 67. Dias, I. H. K.; Polidorib, M. C.; Li, L.; Weber, D.; Stahlb, W.; Nellese, G.; Gruned, T.; Griffiths, H. R. Plasma levels of HDL and carotenoids are lower in dementia patients with vascular comorbidities. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, 40, 399–408.
 68. Zhao, Y.; He, X.; Shi, X.; Huang, C.; Liu, J.; Zhou, S.; Chew-Kiat. Association between serum amyloid a and obesity: A meta-analysis and systematic review. *Inflamm. Res.* **2010**, 59, 323–334.
 69. McEneny, J.; Wade, L.; Young, I. S.; Masson, L.; Duthie, G.; McGinty, A.; McMaster, C.; Thies, F. Lycopene intervention reduces inflammation and improves hdl functionality in moderately overweight middle-aged individuals. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, 24, 163–168.
 70. Brunham, L. R.; Kruit, J. K.; Iqbal, J.; Fievet, C.; Timmins, J. M.; Pape, T. D.; Coburn, B. A.; Bissada, N.; Staels, B.; Groen, A. K.; et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* **2006**, 116, 1052–1062.
 71. Colin, S.; Briand, O.; Touche, V.; Wouters, K.; Baron, M.; Pattou, F.; Hanf, R.; Tailleux, A.; Chinetti, G.; Staels, B.; et al. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- increases high-density lipoprotein production. *Eur. Heart J.* **2012**, 34, 2566–2574.
 72. Hussain, M. M. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* **2014**, 25, 200–206.
 73. Sun, X.; Zhang, Y.; Xie, M. The role of peroxisome proliferator-activated receptor in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Pharm.* **2017**, 67, 1–13.
 74. Carlsen, H.; Haugen, F.; Zadelaar, S.; Kleemann, R.; Kooistra, T.; Drevon, C. A.; Blomhoff, R. Diet-induced obesity increases NF-KB signaling in reporter mice. *Genes Nutr.* **2009**, 4, 215–222.
 75. Scirpo, R.; Fiorotto, R.; Villani, A.; Amenduni, M.; Spirili, C.; Strazzabosco, M. Stimulation of nuclear receptor ppar- γ limits nf-kb-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology* **2016**, 62 (5), 1551–1562.
 76. Seo, Y. Y.; Cho, Y. K.; Bae, J. C.; Seo, M. H.; Park, S. E.; Rhee, E. J.; Park, C. Y.; Oh, K. W.; Park, S. W.; Lee, W. Y. Tumor necrosis factor- α as a predictor for the development of nonalcoholic fatty liver disease: A 4-year follow-up study. *Endocrinol. Metab.* **2013**, 28, 41–45.
 77. Jaeschke, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, 26, 173–179.
 78. Sunny, N. E.; Parks, E. J.; Browning, J. D.; Burgess, S. C. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* **2011**, 14, 804–810.
 79. Haggag, M. E. S. Y. E. S.; Elsanhoty, R. M.; Ramadan, M. F. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pac. J. Trop.*

- Biomed.* **2014**, *4*, 52–58.
80. Sahin, K.; Orhan, C.; Tuzcu, M.; Sahin, N.; Hayirli, A.; Bilgili, S.; Kucuk, O. Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* **2016**, *95*, 1088–1095.

Capítulo III

Conclusão

Em resumo, o licopeno diminuiu os níveis plasmáticos e hepáticos de triglicerídeos, aumentou o HDL, atenuou a esteatose microvesicular, a inflamação e o estresse oxidativo no fígado. Esses achados fornecem informações importantes para futuras pesquisas que visem investigar mecanismos envolvidos nos aspectos fisiopatológicos da esteatose hepática. Visto que a suplementação com licopeno mostrou-se ser uma alternativa terapêutica para distúrbios relacionados à obesidade, como a NAFLD. Diante desses resultados, pode-se concluir que o licopeno está relacionado à modulação de importantes processos fisiopatológicos da NAFLD.

Anexo

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1266/2018-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: "**Efeitos da suplementação do ilcopeno sobre o metabolismo lipídico no fígado de ratos wistar submetidos à dieta hipercalórica rica em carboidratos simples.**", conduzida pela Pesquisadora: **Mariane Róvero Costa**, Orientadora: **Prof. Dr. Fernando Moreto**, com a participação do Colaborador: **Ana Lucia dos Anjos Ferreira, Carol Cristina Vagula de Almeida Silva, Camila Renata Correa Camacho, Artur Junio Togneri Ferron, Fabiana Kurukawa Hasimoto e Jéssica Leite Garcia**, registrada com o nº 1266/2018, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 24 de maio de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30 de abril de 2020
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos - Wistar
Nº de animais	24
Idade/Peso	8 semanas - 250 gramas
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Departamento de Patologia


Graziela Nogueira Bertani
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP


Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br



unesp



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609

E-mail Secretaria:

ceua@fmb.unesp.br/graziela@fmb.unesp.br/sara.sampaio@fmb.unesp.br

Rua: João Buttignoli, s/nº - Distrito Rubião Junior - Botucatu/SP

CEP: 18.618-970



Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Ofício nº 018/2018-CEUA-FMB/UNESP

Botucatu, 14 de dezembro de 2018.

Prezada Senhor,

Em atendimento ao documento protocolado em 29 de outubro de 2018, solicitação na alteração de título referente ao Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEUA 1266-2018**) - **Título:** "Efeitos da suplementação do licopeno sobre o metabolismo lipídico no fígado de ratos wistar submetidos à dieta hipercalórica rica em carboidratos simples", aprovado em 24/05/2018 -, informo que alteração solicitada foi **AUTORIZADA**, ficando na seguinte conformidade.

Título Anterior: "Efeitos da suplementação do licopeno sobre o metabolismo lipídico no fígado de ratos wistar submetidos à dieta hipercalórica rica em carboidratos simples."

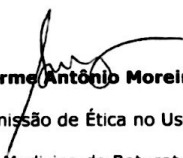
Título Novo: "Efeitos da suplementação com licopeno sobre a fisiopatologia da doença gordurosa não-alcóolica do fígado induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos simples."

Pesquisador Principal atual: Mariane Róvero Costa

Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto

Co orientador: Profa. Dra. Camila Renata Camacho

Atenciosamente,


Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Ilustríssimo Senhor

Professor Doutor Fernando Moreto

Departamento Pós-Graduação em Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP