



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

Núbia Alves Grandini

**Efeitos da suplementação de carnosina sobre a
doença hepática gordurosa associada às
alterações metabólicas induzidas por dieta em
ratos**

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(a): Prof. Dr. Fernando Moreto
Coorientador(a): Profa. Dra. Camila Renata Corrêa

**Botucatu
2023**

Núbia Alves Grandini

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
CARNOSINA SOBRE A DOENÇA HEPÁTICA
GORDUOSA ASSOCIADA ÀS ALTERAÇÕES
METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA EM
RATOS

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 (a): Prof.Dr. Fernando Moreto
Coorientador(a): Profa.Dra. Camila Renata Corrêa

Botucatu
2023

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

Grandini, Núbia Alves.

Efeitos da suplementação de carnosina sobre a doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas induzidas por dieta em ratos / Núbia Alves Grandini. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Fernando Moreto

Coorientador: Camila Renata Corrêa

Capes: 40105008

1. Carnosina. 2. Dieta. 3. Hepatopatia gordurosa não alcoólica. 4. Obesidade.

Palavras-chave: Carnosina; Dieta hipercalórica; Doença hepática gordurosa associada às alterações ; Obesidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Beto e Nádia, por sempre me ensinarem o valor da educação, por todo apoio e por serem meu alicerce sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Moreto, pela oportunidade, orientação e paciência comigo durante este período.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Camila Renata Corrêa, por toda paciência, disposição, conselhos, apoio e por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório Redox e Inflamação, por toda ajuda durante este período, em especial a Cristina Schmitt Gregolin, Gabriela Souza Barbosa e Rebeca Mayara Padilha Rego, que me acolheram desde o início da minha jornada no laboratório.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo e toda equipe do Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental (LCQE), por todo empenho, paciência e auxílio nos experimentos.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), por todo suporte e por viabilizarem o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron e Profa. Dra. Jéssica Leite Garcia, por todas as sugestões e considerações importantes para o enriquecimento deste trabalho.

À coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia, Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva e à secretária deste programa, Vânia do Amaral Soler, por todo auxílio e disposição nestes anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo 131679/2021-0) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos e familiares, pela compreensão e apoio durante estes anos.

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública que acomete bilhões de pessoas ao redor do mundo. O alto consumo de dietas ricas em açúcar e gordura está relacionado ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas (MAFLD). A carnosina (CAR) é um dipeptídeo natural, que possui ação antioxidante e anti-inflamatória, e vem sendo estudada para o tratamento e prevenção de doenças. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de CAR sobre a MAFLD induzida por dieta em ratos. Foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos distribuídos em 2 grupos alimentados com diferentes dietas para indução da MAFLD: normocalórica (n=12) e hipercalórica rica em lipídeos e carboidratos simples (n=12). Após 17 semanas os animais foram redistribuídos em grupos experimentais para avaliação do tratamento (4 semanas): grupo controle com dieta normocalórica (Co, n=6), grupo controle com dieta normocalórica suplementado com CAR (Co+CAR, n=6), grupo MAFLD com dieta hipercalórica (MAFLD, n=6) e grupo MAFLD com dieta hipercalórica suplementado com CAR (MAFLD+CAR, n=6). Os animais receberam água e ração *ad libitum*, e a CAR foi administrada na dose de 250mg/kg/dia, por via intraperitoneal. Os grupos que receberam a dieta hipercalórica também receberam sacarose na água de beber numa concentração de 25%. O grupo MAFLD apresentou maior índice de adiposidade, pressão arterial sistólica, glicemia, IPGTT (*Intraperitoneal Glucose Tolerance Test*), triglicerídeos e colesterol plasmáticos e hepáticos, insulina, HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), bem como esteatose hepática, AOPP (*Advanced Oxidation Protein Products*) plasmática e hepática, e menor expressão de PPAR- α (*Peroxisome Proliferator-activated receptor α*) em comparação ao grupo Co. A CAR atenuou os níveis de triglicerídeos e colesterol plasmáticos e hepáticos, IPGTT, esteatose hepática, macrófagos CD68+ e AOPP plasmática e hepática, além de aumentar os níveis de colesterol HDL e PPAR- α em comparação ao grupo MAFLD não tratado. A CAR atuou em importantes processos fisiopatológicos da MAFLD, podendo ser um composto terapêutico para o controle da doença.

Palavras-chave: doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas, carnosina, obesidade, dieta hipercalórica.

ABSTRACT

Obesity is a public health problem affecting billions of people worldwide. High consumption of diets high in sugar and fat is related to the development of Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). Carnosine (CAR) is a natural dipeptide with antioxidant and anti-inflammatory action and has been studied for treating and preventing diseases. Thus, this work aimed to verify CAR supplementation's effects on MAFLD induced by diet in rats. Twenty-four male Wistar rats were divided into 2 groups fed different diets for MAFLD induction: normocaloric (n=12) and hypercaloric rich in lipids and simple carbohydrates (n=12). After 17 weeks, the animals were redistributed into experimental groups for evaluation of the treatment (4 weeks): control group with normocaloric diet (Co,n=6), control group with normocaloric diet supplemented with CAR (Co+CAR, n=6), MAFLD group with high-calorie diet (MAFLD, n=6) and MAFLD group with a high-calorie diet supplemented with CAR (MAFLD+CAR, n=6). The animals received food and water ad libitum, and CAR was administered at a dose of 250mg/kg/day intraperitoneally. The groups that received the hypercaloric diet also received sucrose in the drinking water at 25%. The MAFLD group had a higher adiposity index, systolic blood pressure, blood glucose, IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test), plasma and liver triglycerides and cholesterol, insulin, HOMA (Homeostasis Model Assessment), as well as hepatic steatosis, plasma and hepatic AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), and lower expression of PPAR- α (Peroxisome Proliferator-activated receptor α) compared to the Co group. CAR attenuated plasma and hepatic triglyceride and cholesterol levels, IPGTT, hepatic steatosis, CD68+ macrophages, and plasma and hepatic AOPP, in addition to increasing HDL cholesterol and PPAR- α levels compared to the untreated MAFLD group. CAR attenuates important pathophysiological processes of MAFLD and may be a therapeutic compound to control the disease.

Keywords: Metabolic-associated fatty liver disease, carnosine, obesity, hypercaloric diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia do fígado.	15
Figura 2. Lóbulo hepático.	16
Figura 3. Progressão da DHGNA.	18
Figura 4. Representação da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante.	21
Figura 5. Estrutura química da Carnosina e suas variantes naturais.	23
Figura 6. Síntese endógena de Carnosina.	24
Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental.	42
Figura 8. Caracterização Nutricional.....	47
Figura 9. Níveis de Pressão Arterial Sistólica.....	48
Figura 10. Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (IPGTT).	51
Figura 11. Determinação de esteatose hepática por parâmetros histológicos.	52
Figura 12. Efeitos da suplementação de CAR na densidade de macrófagos CD68+.	53
Figura 13. Marcador de Estresse Oxidativo - AOPP.	54
Figura 14. Níveis hepáticos de Triglicerídeos e Colesterol.....	55
Figura 15. Expressão gênica do PPAR- α no tecido hepático.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de Peso e Obesidade.....	48
Tabela 2. Marcadores Bioquímicos e Hormonais.	49
Tabela 3. Marcadores do Metabolismo de Lipídios e Glicose.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AGE	<i>Advanced Glycation End-products</i>
AGL	Ácido Graxo Livre
ALE	<i>Advanced Lipoxidation End-products</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AOPP	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CAR	Carnosina
CAT	Catalase
cDNA	Ácido dextrorribonucleico complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
ChREBP	<i>Carbohydrate Reponse Element-binding Protein</i>
CN1	Carnosinase-1
CN2	Carnosinase-2
DAB	3'3-diaminobenzidina
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa não Alcoolica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EHNA	Esteatohepatite não Alcoolica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GLUT2	<i>Glucose Transporter 2</i>

GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
GSSG	Glutathione Oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	Hematoxilina & Eosina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
IPGTT	<i>Intraperitoneal Glucose Tolerance Test</i>
KI	Iodeto de Potássio
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAFLD	<i>Metabolic-associated Fatty Liver Disease</i>
MDA	Malondialdeído
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAFLD	<i>Non-alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NAS	<i>NAFLD Activity Score</i>
NASH	<i>Non-alcoholic Steatohepatitis</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>

NO-	Óxido Nítrico
Nrf-2	Fator Nuclear-E2 Relacionado ao Fator 2
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Radical Hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	Proteína C reativa
PEPT	<i>Peptide Transporter</i>
PHT	<i>Peptide/histidine Transporter</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor</i>
RI	Resistência à Insulina
RNA	Ácido Ribonucleico
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
SREPB1c	<i>Sterol Regulatory Element-binding Protein 1c</i>
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador-β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-α
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Revisão de Literatura

1. Obesidade.....	13
2. O Fígado: morfologia e funções	15
3. Doença Hepática Gordurosa Associada às Alterações Metabólicas ...	18
4. Carnosina	23
5. Justificativa e Hipótese	27
6. Objetivos.....	28
6.1. Objetivo Geral	28
6.2. Objetivos Específicos.....	28
Referências Bibliográficas	28

CAPÍTULO II – Artigo científico

Efeitos da suplementação de carnosina sobre pilares fisiopatológicos da doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas induzida em ratos por dieta	37
Conclusão	76
Anexo 1	78
Anexo 2	79

Capítulo I

Revisão de Literatura

1. Obesidade

Nos últimos tempos, o aumento da prevalência da obesidade vem causando grande preocupação, principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil (1,2). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a obesidade como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode prejudicar a saúde dos indivíduos, incluindo crianças e adolescentes (3). Considera-se uma pessoa adulta obesa quando possui o Índice de massa corporal (IMC) acima de 30 kg/m^2 , cujo qual é calculado a partir da altura e peso corporal, levando em consideração a idade e sexo do indivíduo (2).

A obesidade vem sendo considerada uma epidemia mundial, decorrente do seu grande e acelerado aumento. A OMS estima que no mundo em 2025, 2,3 bilhões de indivíduos da população adulta estará acima do peso e destes, 700 milhões estarão com obesidade (4). No Brasil, segundo as pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o excesso de peso e a obesidade vêm aumentando de forma contínua e significativa nos últimos 18 anos (2). Os dados apresentados pela Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2021, apontam que a frequência da obesidade é semelhante entre homens e mulheres, porém maior entre o público feminino (22% e 22,6%, respectivamente) (5).

A principal causa da obesidade é o desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas, uma vez que há um aumento no consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura, e uma diminuição na prática de exercícios físicos nos últimos tempos (3). O alto consumo de *fast-foods* está associado ao desenvolvimento da obesidade e de alterações metabólicas, um estudo realizado com indivíduos adultos dos Estados Unidos apontou que mais de 35% dos indivíduos consomem *fast-foods* duas ou mais vezes por semana (6,7). Isso se dá principalmente, devido a mudanças no estilo de vida da população, cada vez mais sedentária e com uma carga excessiva de trabalho, tornando a procura por alimentos industrializados e de “rápido acesso” cada vez maior (8,9). Nos últimos 2 anos este aumento foi influenciado também pela pandemia de Covid-19, que assolou o mundo e culminou na adesão do *lockdown* por diversos países, favorecendo a alimentação inadequada e a falta da prática de exercícios físicos (10).

Com esse balanço energético positivo, ocorrem alterações significativas no tecido adiposo e consequentemente, em outros órgãos. Além de ser o responsável pela reserva de energia do organismo, o tecido adiposo possui outras funções importantes nos mamíferos, como a regulação de processos fisiológicos, adipogênese, angiogênese, reestruturação da matriz extracelular, bem como a participação no metabolismo de esteróides e manutenção da temperatura e homeostasia do organismo (11). Sua capacidade de armazenamento de gorduras não é ilimitada e na presença de um excesso de nutrientes, como na obesidade, ocorre a expansão deste tecido, através da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, associada a redução de fluxo sanguíneo com consequente hipóxia, alteração no metabolismo lipídico, inflamação e morte celular. Essa atividade gera uma disfunção no tecido adiposo, causando alterações na secreção de adipocinas, como a diminuição de adiponectina, que realiza o armazenamento fisiológico de gorduras, e aumento de citocinas pró-inflamatórias, sendo um fator primordial para o desenvolvimento de comorbidades associadas a obesidade e o acúmulo de gordura em outros órgãos, como o fígado (12,13).

O acúmulo de gordura visceral está intimamente ligado ao desenvolvimento da Síndrome Metabólica, sendo esta uma das consequências do consumo da chamada dieta ocidental, que é definida pelo grande consumo de alimentos e bebidas ultra processados, bem como excesso de carboidratos refinados e gordura saturada. Seu alto consumo também está associado ao desenvolvimento de outras comorbidades, incluindo doenças cardiovasculares e lesões hepáticas, como a Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA ou NAFLD, do inglês *Non-alcoholic fatty liver disease*), onde há o acúmulo de gordura no fígado sem o uso de álcool (14,15). Recentemente, um painel de especialistas propôs uma nova nomenclatura e critérios para o diagnóstico da DHGNA, denominando-a de doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas (MAFLD, do inglês *Metabolic-associated fatty liver disease*) (16). Ademais, o desenvolvimento da DHGNA está intimamente associado às desordens metabólicas, como o diabetes (22-43% pacientes) e a obesidade (51-81% dos pacientes), justificando sua recente nomenclatura para MAFLD (17).

2. O fígado: morfologia e funções

Considerado o maior órgão visceral e o segundo maior do corpo humano, o fígado pesa aproximadamente 1,5 kg e está localizado abaixo do diafragma, na parte superior da cavidade abdominal (18,19). É dividido anatomicamente em 4 lobos: direito e esquerdo, com base nas ramificações da veia porta, lobo quadrado, na região da vesícula biliar e lobo caudado, próximo a veia cava (Figura 1) (20).

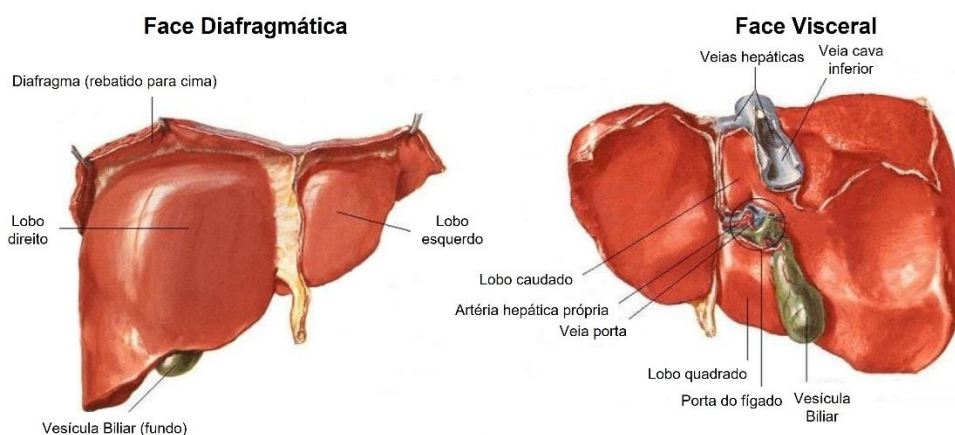


Figura 1. Anatomia do Fígado. Dividido em duas faces: diafragmática (com os lobos direito e esquerdo) e visceral (com os lobos direito, esquerdo, caudado e quadrado). Adaptado de Netter (21).

Possui funções altamente complexas e contribui para a manutenção da homeostase do organismo, na forma de um biofiltro ativo, sendo o responsável por transportar e filtrar o sangue proveniente da digestão, com compostos nutricionais e tóxicos, bem como o sangue sistêmico, rico em oxigênio (22).

O fígado é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo e suas células são chamadas de Hepatócitos, que estão agrupados em placas interconectadas; é composto por unidades estruturais chamadas de lóbulos hepáticos. Em alguns animais, como os ratos, estas unidades são bem delimitadas, possuindo uma margem nítida que divide a face superior da inferior e apresenta um aspecto uniforme, com vários cordões de células epiteliais dispostas de forma radial ao redor do vaso, diferentemente dos humanos, onde os lóbulos estão bem unidos, sendo difícil delimitá-los (19,23,24). Existem algumas áreas nas superfícies dos lóbulos em que podem ser encontrados vasos sanguíneos, nervos, ductos biliares e vasos linfáticos

juntamente com tecido conjuntivo, sendo denominados de espaços porta. Entre as placas de hepatócitos estão os sinusóides hepáticos, capilares constituídos de células endoteliais e macrófagos, chamados de células de Kupffer (Figura 2). Inclusive, os sinusóides são responsáveis por delimitar o espaço de Disse, onde podem ser encontradas as células de Ito, também conhecidas como células estreladas hepáticas, que em situações normais possuem a função de armazenar lipídios e vitaminas, porém no caso de uma lesão hepática, estas são ativadas e diferenciadas em miofibroblastos, tornando-se a principal via na fibrogênese hepática (19,25,26).

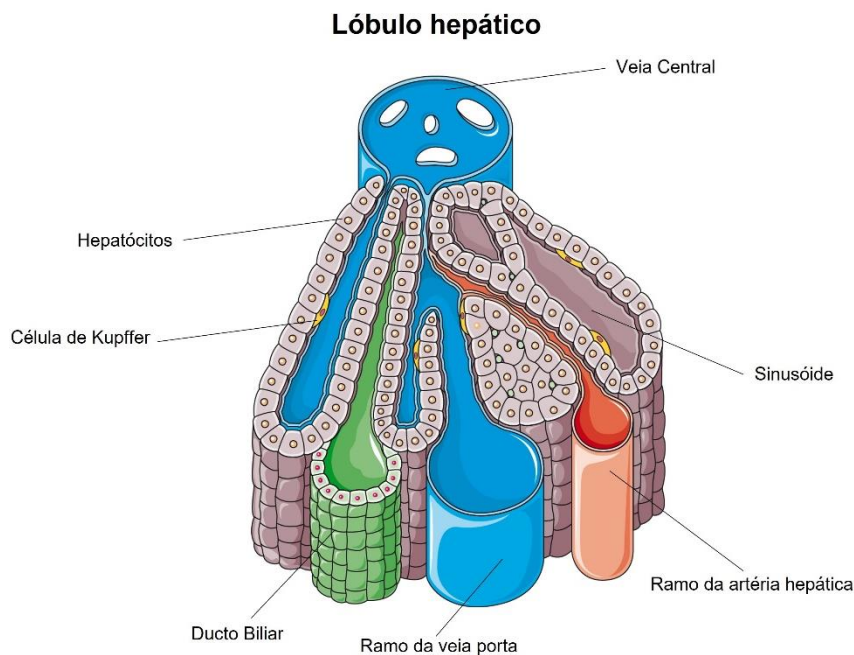


Figura 2. Lóbulo hepático. Ao centro encontra-se a veia centrolobular e abaixo estão o ducto biliar e os ramos da veia porta e da artéria hepática. Adaptado de Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License (27).

O fígado possui funções importantíssimas para o organismo, incluindo a síntese de bile e proteínas, armazenamento de componentes (vitaminas, ferro, entre outros), metabolismo de lipídios e carboidratos, bem como a metabolização de fármacos, como antibióticos e hormônios esteróides (28–30).

Após a absorção dos nutrientes pela alimentação, o fígado recebe uma grande quantidade de aminoácidos para serem metabolizados, sendo estes encaminhados juntamente com os aminoácidos produzidos por ele mesmo, para a síntese de proteínas que serão enviadas para a corrente sanguínea. A proteína presente em maior quantidade é a albumina, responsável por realizar

o transporte de diversas substâncias para o sangue, incluindo medicamentos, hormônios, ácidos graxos e nutrientes. Além dela, outras proteínas com importantes funções são sintetizadas no fígado, como é o caso da protrombina e o fibrinogênio (30,31).

No metabolismo de carboidratos o fígado possui o importante papel de controlar os níveis de glicose no sangue, uma vez que ele é o órgão responsável por liberá-la no sangue, através da glicose-6-fosfatase. Logo após o processo de digestão no intestino, a glicose é captada por meio de GLUT2 (do inglês, *glucose transporter*), um transportador de baixa atividade e alta afinidade, e é transportada ao fígado através da veia porta. Uma vez no fígado, a glicose possui diversos destinos: síntese de ácidos graxos, síntese de colesterol, síntese de glicogênio, síntese de NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e síntese de corpos cetônicos (30,32).

Os lipídios são primeiramente absorvidos na circulação sanguínea, devido as suas propriedades lipossolúveis, e então são transportados para o fígado através das lipoproteínas. No caso dos lipídios provenientes da alimentação, estas lipoproteínas são chamadas de quilomícrons, são produzidas no intestino e transportam os lipídios através dos ductos linfáticos, circulação sanguínea, demais tecidos e por último o fígado. Quilomícrons remanescentes são os triglicerídeos e colesterol restantes que não foram absorvidos pelos adipócitos, sendo estes captados pelos hepatócitos para posterior degradação do colesterol restante e excreção pela bile. Existem lipoproteínas de diversas densidades, são elas: de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), responsável por transportar o colesterol remanescente para a degradação hepática; de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), que possui a função de transportar os triglicerídeos para o tecido adiposo; e de alta densidade (HDL), responsável por retirar o colesterol livre da circulação sanguínea (31,33).

Os PPARs (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*) estão envolvidos na transcrição de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico. Há três isoformas dos PPARs: PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ , que são expressas em diversos tecidos. PPAR- α é encontrado em tecidos que utilizam ácidos graxos como fonte de energia, portanto apresenta altas taxas de β -oxidação, sendo expresso em sua maioria no fígado. Sua expressão é inversamente

proporcional à progressão da gravidade histológica da MAFLD e diretamente proporcional à melhora do estado inflamatório. O PPAR- α tem como principal função a regulação do metabolismo lipídico hepático, desempenhando um papel fundamental no catabolismo lipídico, através da regulação de genes alvo envolvidos na β -oxidação, captação e ativação de ácidos graxos e lipólise (34–36).

Dessa forma, é notável que o fígado exerce um papel de suma importância no metabolismo de diversos nutrientes e os desequilíbrios e deficiências nestes processos podem acarretar diversos problemas para o homem. No caso do desequilíbrio, mais especificamente o excesso, relacionado a carboidratos na forma de açúcares e gorduras, pode ser prejudicial para a função hepática de degradar estes componentes, gerando o acúmulo dos mesmos e o desenvolvimento da MAFLD.

3. Doença Hepática Gordurosa Associada às Alterações Metabólicas

Sendo considerado o distúrbio metabólico adquirido mais comum, a DHGNA se dá pelo acúmulo excessivo de triglicerídeos no fígado, afetando cerca de 25% da população mundial. Sua incidência nos últimos anos está relacionada a mudança nos hábitos e consumos alimentares da população e seu aumento ocorre paralelamente a epidemia mundial de obesidade (17). Faz parte de um espectro progressivo de lesão hepática, que inclui a esteatose hepática simples, esteatohepatite não alcoólica (EHNA ou NASH, do inglês *Non-alcoholic steatohepatitis*) podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepático (Figura 3) (37).

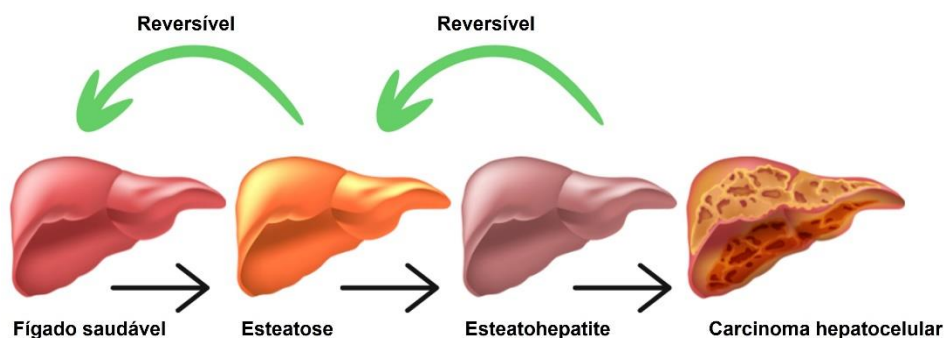


Figura 3. Progressão da DHGNA. Elaborado pelo autor.

Apesar de ser a causa mais comum de doença hepática crônica, a definição da DHGNA não engloba quadros metabólicos e possui como critério de exclusão o uso significativo de álcool, outras hepatopatias crônicas e o uso de medicamentos para o tratamento de esteatose. Diante disso, o termo MAFLD foi criado para melhor compreensão e diagnóstico da doença. A definição da MAFLD se dá a partir da presença de esteatose hepática, com a adição de um dos dois fatores a seguir: sobrepeso ou obesidade (definidos a partir do IMC) e diabetes mellitus do tipo 2, ou com dois dos fatores de risco metabólicos a seguir, no caso de indivíduos magros e que não possuem diabetes tipo 2: circunferência abdominal (≥ 102 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres), hipertensão ($\geq 130/85$ mmHG ou em uso de anti-hipertensivos), dislipidemia (triglicerídeos plasmáticos ≥ 150 mg/dL, colesterol HDL < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres, ou em uso de medicamentos), pré-diabetes, resistência insulínica (RI) e altos níveis de PCR (Proteína C reativa, > 2 mg/L) (38,39).

O mecanismo fisiopatológico da DHGNA/MAFLD não está bem elucidado, mas por muitos anos acreditou-se em um modelo de “dupla agressão” (ou “*two hits*”), onde primeiramente há um desequilíbrio entre as vias hepáticas de aquisição e eliminação dos lipídios causados pela RI, gerando o acúmulo de gordura que o estimula a induzir inflamação e morte celular por uma segunda agressão, promovendo o estresse oxidativo hepático, culminando na EHNA (40). Atualmente há uma hipótese de que seu desenvolvimento está relacionado a “múltiplas agressões” (ou “*multiple hits*”), onde vários fatores estão envolvidos, sendo eles de ordem genética, epigenética, nutricional, comportamental, além das alterações na microbiota, a inflamação e estresse oxidativo, sendo este último considerado um dos principais contribuintes para a concepção e progressão da doença hepática gordurosa (41). A RI continua sendo um dos fatores primordiais para o desenvolvimento da esteatose hepática, porém com a denominação MAFLD, propõe-se definir a disfunção metabólica como o elemento principal do desenvolvimento da doença, associado aos outros fatores (42).

O alto consumo da dieta ocidental associada ao estilo de vida sedentário, gera efeitos deletérios para o fígado, sendo um fator de alto risco para o desenvolvimento da MAFLD, bem como de sua evolução negativa. A

frutose é um carboidrato que tem sido utilizado amplamente em alimentos e bebidas industrializados, seu excesso provoca a lipogênese *de novo* no fígado, sendo responsável por grande parte do aumento da concentração de ácidos graxos neste tecido (43).

Em situações normais, diversas organelas como o retículo endoplasmático, peroxissomos e as mitocôndrias produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir de processos fisiológicos, sendo as mitocôndrias responsáveis pela maioria da produção. Normalmente, as células mantêm os níveis de EROs controladas, a fim de manter a sinalização redox necessária para vários processos (44).

O estresse oxidativo se dá pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas antioxidantes, que podem ser enzimáticos ou não. As EROs são classificadas em radicais livres, como o superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO^-), e em espécies não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (45). A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por converter o O_2^- em H_2O_2 , que posteriormente será convertido em água (H_2O) pelas enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). Para que ocorra a reação do peróxido com a enzima GPX, é necessário que após o contato com o agente oxidante, a glutathione reduzida (GSH) seja convertida em glutathione oxidada (GSSG) (Figura 4). A glutathione redutase (GSR) é a enzima responsável pela recuperação da GSH, mantendo o equilíbrio adequado entre o sistema antioxidante. Apesar do H_2O_2 não ser um radical livre, seu acúmulo pode gerar através das reações de Fenton e Haber-Weiss, o radical hidroxil ($OH^\bullet$), considerada a ERO mais reativa e que não há defesa enzimática (46,47).

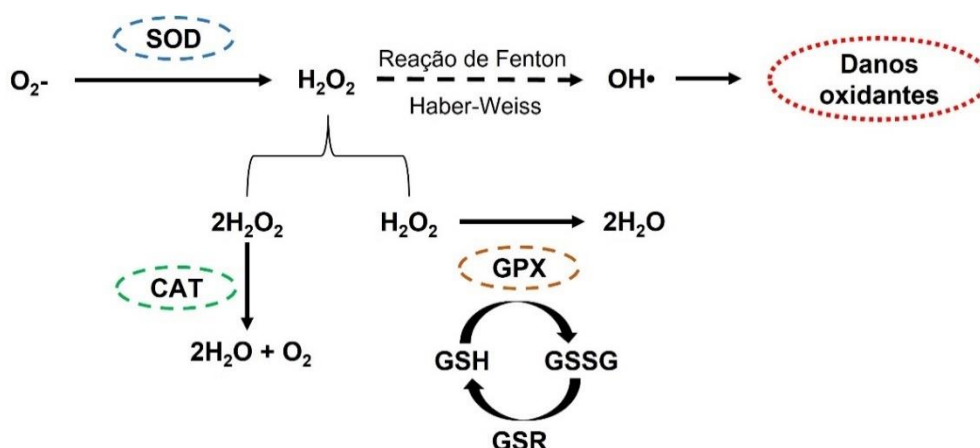


Figura 4. Representação da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante. A enzima SOD é responsável pela conversão de O_2^- em H_2O_2 , que é reduzido a H_2O através das enzimas CAT e GPX. Se estiver em excesso, o H_2O_2 pode reagir com metais ou o superóxido, formando o radical hidroxil. O_2^- : superóxido de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; CAT: catalase; H_2O : água; GPX: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; GSR: glutathione redutase; $OH^\bullet$: radical hidroxil. Elaborado pelo autor.

O acúmulo de lipídios no fígado favorece a superprodução de EROs, que em altas concentrações gera a diminuição da atividade dos sistemas antioxidantes, causando diversas alterações estruturais e oxidativas no metabolismo de macromoléculas celulares, como carboidratos, ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas, gerando produtos que também podem causar prejuízos celulares. A oxidação de carboidratos gera os produtos de glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation end-products*), como o glicoxal e o metilglicoxal, a oxidação de lipídios gera os produtos de lipoxidação avançada (ALE, do inglês *advanced lipoxidation end-products*), como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e a oxidação de proteínas gera os produtos de oxidação de proteína avançada (AOPP, do inglês *advanced oxidation protein products*) (48–50).

A esteatose hepática surge a partir do desequilíbrio entre a produção e a degradação de ácidos graxos, devido a sobrecarga da capacidade metabólica do fígado. Os ácidos graxos livres (AGLs) são os responsáveis pelo acúmulo de lipídio hepático e as principais fontes destes compostos são: lipogênese *de novo*, onde os hepatócitos convertem o excesso de glicose e frutose em gordura; ácidos graxos não esterificados e lipólise periférica, que ocorre devido

a RI, liberando uma carga excessiva de ácidos graxos ao fígado; e a dieta. A RI no músculo esquelético resulta em altos níveis de insulina e glicemia, que por sua vez induzem a ativação da proteína de ligação ao elemento resposta à carboidratos (ChREBP, do inglês *carbohydrate reponse element-binding protein*) e a expressão da proteína de ligação ao elemento regulatório esterol 1c (SREPB1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein 1c*) nos hepatócitos, aumentando a síntese hepática de lipídios e contribuindo para a esteatose no fígado. Os AGLs são eliminados através da β -oxidação mitocondrial, porém, a alta concentração destes componentes gera uma disfunção nas mitocôndrias, culminando no acúmulo de ácidos graxos na forma de triglicerídeos e alguns transportados para a corrente sanguínea através de VLDL (44,51,52).

Diante da presença da esteatose hepática e o contínuo consumo de ácidos graxos e açúcares provenientes da dieta, ocorre lesão nos hepatócitos e morte celular, que em conjunto com o processo inflamatório desencadeado, causa a EHNA, com deposição progressiva de colágeno e subsequente remodelação, podendo ocorrer fibrogênese hepática, através da ativação das células estreladas hepáticas, cirrose e posteriormente o câncer hepatocelular. A lesão nos hepatócitos é a principal diferença entre a MAFLD e EHNA, que pode ser desenvolvida pelo estresse oxidativo e a produção exacerbada de EROS, decorrentes do acúmulo de lipídios no tecido hepático. Outra característica fundamental da EHNA é a ativação do sistema imunológico, com as células de Kupffer e os macrófagos como atuantes principais, além das células T que atuam como recrutadoras de macrófagos e aumentam a secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6 (Interleucina 6) (53,54).

Os modelos animais de doenças humanas são essenciais nos processos de pesquisa pré-clínica, uma vez que facilitam os estudos relacionados aos mecanismos e processos terapêuticos das doenças (55). Estudos relatam que o modelo em animais, com MAFLD/EHNA induzida por dieta rica em açúcar e gordura é o que mais se assemelha metabólica e histologicamente à MAFLD desenvolvida em humanos, uma vez que mimetiza os hábitos alimentares humanos e desenvolve alterações relacionadas a patogenia da MAFLD (56,57).

Atualmente não há um tratamento farmacológico específico para a MAFLD que esteja aprovado para uso, entretanto alguns medicamentos para

tratar hiperglicemia e dislipidemia podem ser indicados nos casos de esteatose hepática. Por outro lado, há outras formas de tratamento, mais acessíveis e “naturais”, incluindo a mudança no estilo de vida, a prática de exercícios físicos, hábitos alimentares mais saudáveis, com diminuição no consumo de alimentos industrializados e ricos em açúcar e gordura, bem como o uso de compostos bioativos (58–60). Diante da grande quantidade de indivíduos afetados pela MAFLD no mundo, torna-se necessária a busca por meios de tratamento e prevenção para estas condições.

4. Carnosina

A carnosina (CAR) é um exemplo de composto bioativo e foi descoberta em 1900 por um cientista russo chamado Gulewitch, que realizava uma pesquisa sobre compostos nitrogenados não proteicos no extrato de carne. É um dipeptídeo sintetizado naturalmente, não-tóxico, composto por β -alanina e L-histidina e é encontrado em maiores concentrações no músculo esquelético de animais vertebrados, assim como em outros tecidos, como coração, cérebro e no trato gastrointestinal de humanos. Possui diversas variantes, sendo os análogos metilados as mais comuns, como anserina e ofidina (balenina), que possuem o anel imidazol metilado da L-histidina (Figura 5) (61,62).

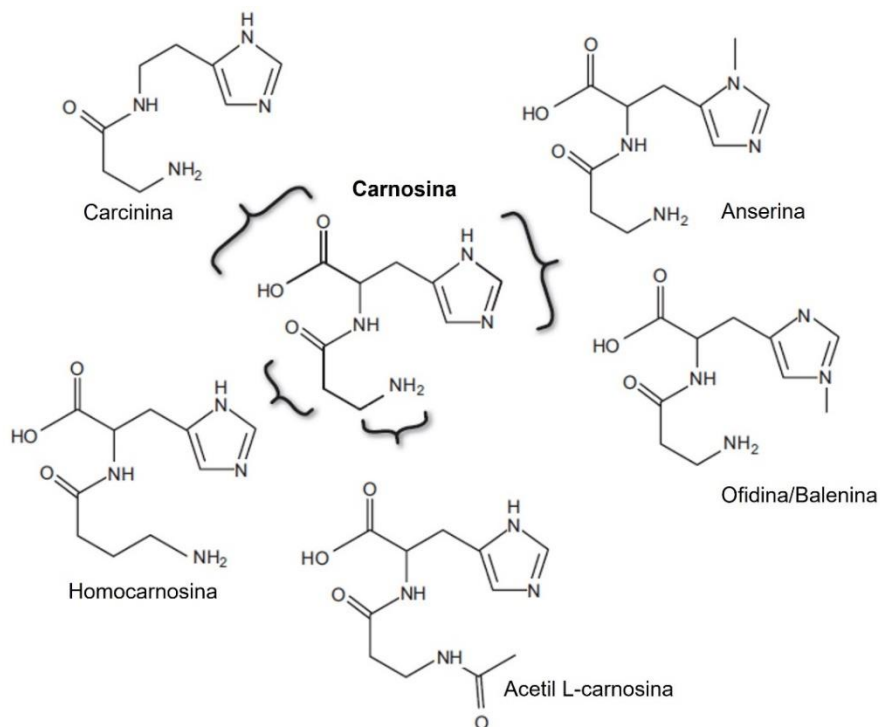


Figura 5. Estrutura química da Carnosina e suas variantes naturais. Adaptado de Boldyrev, Aldini e Derave, 2013 (50).

Apesar de seu efeito fisiológico ainda não estar bem definido, a CAR desempenha diversos papéis no organismo. Atua como agente tamponante, importante para o equilíbrio ácido-base, possui atividade quelante de metais pesados, eliminação de radicais livres, bem como atividade antiglicante. Estudos apontam para a CAR como um antioxidante natural, com propriedades anti-inflamatórias e neuro protetivas (61,63).

A síntese de CAR é catalisada pela enzima carnosina sintase e ocorre a partir da ligação do aminoácido β -alanina, disponibilizado através da degradação hepática de compostos dietéticos provenientes do consumo de carne, e de L-histidina, aminoácido essencial encontrado no soro, com propriedades bioativas (Figura 6) (64).

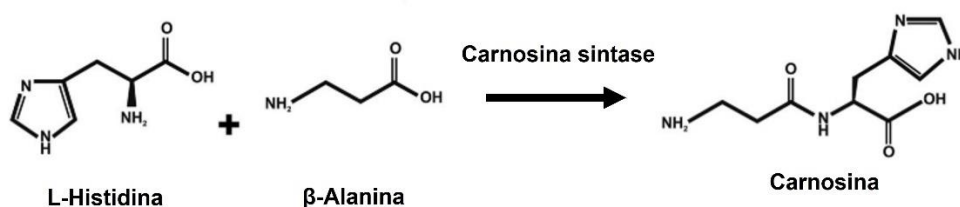


Figura 6. Síntese endógena de Carnosina. Adaptado de Artioli, Sale e Jones (2019) (52).

Sua decomposição não ocorre através de peptidases comuns, mas sim a partir de suas próprias enzimas hidrolíticas, as carnosinases, encontradas em duas isoformas: carnosinase-1 (CN1), ou carnosinase sérica, e carnosinase-2 (CN2), ou carnosinase tecidual. A CN1 é encontrada normalmente no soro humano e é ausente nos mamíferos não primatas, com exceção de uma determinada espécie de hamster. Pode ser produzida no cérebro, mas sua produção é majoritariamente no fígado e sintetizada na circulação sanguínea, portanto, algumas alterações hepáticas como a cirrose, podem afetar significativamente os níveis desta enzima no sangue. Já a CN2, também chamada de dipeptidase citosólica não específica, é encontrada em diversos tecidos e não no soro, sendo esta dependente do metal manganês (62,65,66).

O transporte de CAR pela membrana celular é realizado por transportadores de peptídeos, sendo eles: PEPT1, PEPT2 (do inglês, *peptide transporter 1 and 2*), PHT1 e PHT2 (do inglês, *peptide/histidine transporter 1*

and 2), cujo quais possuem uma ampla especificidade e são capazes de transportar não apenas a CAR, como também seus análogos metilados (62,67). PEPT1 é um transportador de alta capacidade e baixa afinidade, possui um papel de grande importância na absorção de dipeptídeos no intestino; PEPT2 possui baixa capacidade e alta afinidade, contribui para a reabsorção de peptídeos filtrados no rim. Após a ingestão oral, a CAR pode ser absorvida no intestino e uma parte não hidrolisada é transportada para a circulação sanguínea (65,68).

A função biológica mais popular da CAR está relacionada a performance esportiva e a homeostase do músculo esquelético, por este motivo diversos estudos foram realizados acerca do assunto. Sua ação tamponante no músculo a torna um composto interessante para exercícios de alta intensidade, uma vez que nestas situações, pode ocorrer um acúmulo de íons H^+ e este pode ser melhorado devido ao aumento da capacidade tamponante do tecido. Estudos apontam que a suplementação com β -alanina aumenta a concentração de CAR no músculo, melhorando a performance nos exercícios físicos. Em humanos, com a suplementação e consequente aumento da CAR no músculo, ocorre a diminuição da acidose no sangue durante a prática de exercícios de alta intensidade, melhorando sua performance (61,69,70). Também possui outras funções importantes no músculo esquelético, como: quelação de íons metálicos, fornecimento extracelular de histidina e histamina, regulação da liberação e sensibilidade ao cálcio e proteção contra as EROs (71).

Pelos altos níveis de CAR encontrados no cérebro e devido a associação com efeitos protetores relacionados ao estresse oxidativo e inflamação, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos a respeito da associação da CAR com o tratamento de diversas desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Parkinson, depressão e demência (72,73). Um estudo realizado com ratos, apontou que a suplementação com CAR preveniu a progressão dos déficits motores causados pela doença de Parkinson (74).

A atividade antioxidante da CAR é mediada por diversos mecanismos relacionados a quelação de metais e eliminação de EROs, assim como de radicais peroxil. Estudos apontam que a capacidade da CAR de proteger e/ou tratar patologias com estresse oxidativo, se dá através da inativação dos

produtos tóxicos gerados neste processo (61). Recentemente Ihara e colaboradores (75) elucidaram outro mecanismo antioxidante deste dipeptídeo, a partir da identificação de um produto de oxidação da CAR, denominado 2-oxo-carnosina, encontrado em homogenatos de tecidos e em células de ratos, que foram expostos ao H_2O_2 . O produto oxidado é produzido a partir da formação de um radical histidil, seguido pela adição de oxigênio. A 2-oxo-carnosina demonstrou ter uma atividade antioxidante mais potente que outros antioxidantes, como a GSH (75). Outro mecanismo antioxidante direto da CAR se dá pela reação com hipoclorito, convertendo-o em uma espécie menos reativa e com redução dos efeitos metabólicos deletérios causado por ele. Dessa forma, a CAR foi apontada como um composto capaz de extinguir espécies oxidantes que estão envolvidas no desenvolvimento e propagação do estresse oxidativo, associado a doenças cardiometabólicas, podendo ter um benefício terapêutico em condições inflamatórias (76).

Aldini e colaboradores (77) relataram que a CAR também pode realizar a atividade antioxidante de forma indireta, uma vez que possui a capacidade de aumentar a expressão e a ativação da via Nrf2 (fator nuclear-E2 relacionado ao fator 2), responsável por regular a transcrição de diversos genes que possuem um elemento de resposta antioxidante (ARE, do inglês *antioxidant response element*). Estes genes incluem enzimas antioxidantes que participam do metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas, assim como de mediadores da inflamação, mantendo assim a homeostase do sistema. Dados na literatura apontam que a CAR é capaz de induzir a translocação nuclear de Nrf2, causando efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, com redução dos níveis de TNF- α (Fator de necrose tumoral- α) e IL-10 (interleucina 10), bem como ativação da heme oxigenase 1, enzima que possui um papel importante na homeostasia celular (77,78).

Outra ação importante da CAR é como agente antiglicante, impedindo que ocorra a glicação, processo no qual aldeídos e cetonas reagem com proteínas e formam proteínas anormais, que posteriormente levam a formação de AGEs (63,79). Em um estudo realizado por Zhao e colaboradores (80), foi constatada a capacidade da CAR em sequestrar diretamente EROs, onde o pré-tratamento com CAR conferiu proteção aos cardiomiócitos contra a

toxicidade do 4-HNE e acroleína, diferentemente do efeito observado com um de seus derivados, a balerina.

Na literatura encontramos estudos em modelo animal, que demonstraram que a CAR é capaz de atenuar o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em camundongos ob/ob (81), melhorar os parâmetros relacionados a síndrome metabólica induzidos por dieta em ratos *Wistar* (82), bem como modular o metabolismo de ferro em grupos de alto risco, melhorando a RI e podendo prevenir o diabetes do tipo 2 (81). Estudos relataram que a CAR foi capaz de melhorar a esteatose hepática em camundongos que consumiram uma dieta rica em gordura (83) e em um modelo de diabetes tipo 2 em camundongos db/db (84).

Apesar das evidências demonstradas, muitos estudos ainda são necessários para consolidar as ações biológicas da CAR. Para nosso conhecimento, poucos estudos buscaram esclarecer seus efeitos sobre deposição ectópica de gordura em tecidos, como o fígado, e seus desfechos patológicos. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para verificar os efeitos do uso da CAR no tratamento da MAFLD.

5. Justificativa e Hipótese

O consumo de dieta hipercalórica com ingestão inadequada de carboidratos simples submete o organismo a condições metabólicas que resultam em alterações morfofuncionais do tecido hepático. Neste cenário, o desequilíbrio redox com estresse oxidativo e o processo inflamatório constituem os principais pilares patogênicos das alterações hepáticas associadas à obesidade e síndrome metabólica, como a MAFLD.

A CAR, dipeptídeo sintetizado naturalmente pelo organismo animal, tem demonstrado potencial de melhora em diversas doenças, além de atuar como um antioxidante com potencial ação anti-inflamatória. Dessa forma, o estudo da aplicabilidade da CAR no tratamento da MAFLD torna-se relevante.

Assim, a hipótese testada neste trabalho foi que a suplementação de CAR atenua a progressão da MAFLD em ratos obesos, atuando sobre os principais pilares patogênicos das complicações hepáticas.

6. Objetivos

6.1. Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de CAR sobre a doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas induzida por dieta em ratos.

6.2. Específicos

1. Caracterizar a presença de obesidade;
2. Caracterizar a presença da MAFLD;
3. Verificar efeitos da suplementação de CAR sobre:
 - a. Parâmetros histológicos hepáticos;
 - b. Marcadores clínicos relacionados a obesidade;
 - c. Concentrações de produtos de oxidação no tecido hepático;
 - d. Expressão gênica de PPAR- α no tecido hepático.

Referências Bibliográficas

1. Ferreira AP de S, Szwarcwald CL, Damacena GN. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. Rev Bras Epidemiol. 2019;22(328):e190024.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2019 - Atenção Primária à Saúde e Informações Antropométricas [Internet]. 2020. 70 p. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101758.pdf>
3. World Health Organization W. Obesity and overweight [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 31]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
4. Mapa da Obesidade - Abeso [Internet]. Available from: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
5. Brasil M da S. Vigitel Brasil 2021 Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. 1st ed. Brasília/DF; 2022. 131 p.
6. Kant AK, Whitley MI, Graubard BI. Away from home meals: associations with biomarkers of chronic disease and dietary intake in American adults, NHANES 2005–2010. Int J Obes [Internet]. 2015 May 16;39(5):820–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/ijo2014183>
7. Duffey KJ, Gordon-Larsen P, Steffen LM, Jacobs DR, Popkin BM. Regular Consumption from Fast Food Establishments Relative to Other Restaurants Is Differentially Associated with Metabolic Outcomes in Young Adults. J Nutr [Internet]. 2009 Nov 1;139(11):2113–8. Available

from: <https://academic.oup.com/jn/article/139/11/2113/4751054>

8. Francisqueti FV, Nascimento AF do, Correa CR. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Nutrire*. 2015;40(1):81–9.
9. Costa dos SC, Machado SP, Nogueira VC, Sampaio HA de C, Farias B de O, Vieira LCO. The dietary inflammatory factor is directly related to anthropometric indicators of obesity in workers of a metallurgical industry. *Nutr Clin y Diet Hosp*. 2019;39(3):22–9.
10. Cristo JVM, Silva FS da, Serique MS, Lobato MYF, Silva FP, Parente F de S, et al. Isolamento social em tempos de pandemia do COVID-19 e sua relação com a obesidade. *Res Soc Dev*. 2021;10(14):e537101422416.
11. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):142–9.
12. 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* [Internet]. 2006 Jul 5;20(9):1540–2. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.05-5678fje>
13. Goossens GH, Blaak EE. Adipose Tissue Dysfunction and Impaired Metabolic Health in Human Obesity: A Matter of Oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2015 Apr 24;6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00055/abstract>
14. Hintze KJ, Benninghoff AD, Cho CE, Ward RE. Modeling the Western Diet for Preclinical Investigations. *Adv Nutr* [Internet]. 2018 May 1;9(3):263–71. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/9/3/263/4964949>
15. Hassani Zadeh S, Mansoori A, Hosseinzadeh M. Relationship between dietary patterns and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2021 Jun 14;36(6):1470–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jgh.15363>
16. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2020 May;158(7):1999-2014.e1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508520301712>
17. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
18. Ragavan S, Muraleedharan A, Bage NN, Devi R. A comprehensive study and extensive review of morphological variations of liver with new insights. *Surg Radiol Anat* [Internet]. 2022;44(3):455–66. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00276-022-02883-1>

19. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004. 488 p.
20. Quiñones-rodríguez JI, Amador R, Silvestrini I. A Comprehensive View into a Novel, Accessory Liver Lobe. *Int J Anat Var*. 2021;14(7):111–3.
21. Netter FH. *Atlas de Anatomia Humana*. 2 ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2000.
22. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, et al. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2020. 1144 p.
23. Vdoviaková K, Vdoviaková K, Petrovová E, Krešáková L, Maloveská M, Teleky J, et al. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Med Sci Monit [Internet]*. 2016 Dec 2;22:4716–28. Available from: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/899129>
24. Covelli V. Guide to the Necropsy of the Mouse [Internet]. ENEA, Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Develo. Available from: http://www.pathbase.net/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php
25. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 2017;14(7):397–411. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
26. Friedman SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev [Internet]*. 2008 Jan;88(1):125–72. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00013.2007>
27. Servier. Servier Medical Art [Internet]. Available from: <https://smart.servier.com/>
28. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicol Pathol*. 2005;33:27–34.
29. Dooley JS, Lok AS, Garcia-Tsao G, Pinzani M. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. 13th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2018. 832 p.
30. Campbell I. Liver : metabolic functions. *Anaesth INTENSIVE CARE Med*. 2006;7(2):51–4.
31. Devlin TM. *Manual de bioquímica: com correlações clínicas*. 7th ed. São Paulo: Editora Blucher; 2011. 1292 p.
32. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep [Internet]*. 2016 Dec 1;36(6). Available from: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/36/6/e00416/56473/Liver-glucose-metabolism-in-humans>
33. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3rd ed. São

Paulo: Sarvier; 2002. 975 p.

34. Costa MR, Garcia JL, Silva CCV de A, Ferron AJT, Francisqueti-Ferron FV, Hasimoto FK, et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Antioxidants*. 2019;8(8):1–17.
35. Yang X, Gonzalez FJ, Huang M, Bi H. Nuclear receptors and non-alcoholic fatty liver disease: An update. *Liver Res* [Internet]. 2020;4(2):88–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.03.001>
36. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
37. Bilson J, Sethi JK, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A multi-system disease influenced by ageing and sex, and affected by adipose tissue and intestinal function. *Proc Nutr Soc*. 2021;146–61.
38. Zhou XD, Cai J, Targher G, Byrne CD, Shapiro MD, Sung KC, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and implications for cardiovascular risk and disease prevention. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2022;21(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01697-0>
39. Wong VWS, Lazarus J V. Prognosis of MAFLD vs. NAFLD and implications for a nomenclature change. *J Hepatol* [Internet]. 2021;75(6):1267–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.08.020>
40. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? *Gastroenterology* [Internet]. 1998 Apr;114(4):842–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508598705992>
41. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* [Internet]. 2016 Aug;65(8):1038–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049515003832>
42. Xian YX, Weng JP, Xu F. MAFLD vs. NAFLD: shared features and potential changes in epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and pharmacotherapy. *Chin Med J (Engl)*. 2020;134(1):8–19.
43. Rives C, Fougerat A, Ellero-simatos S, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payraastre L, et al. Oxidative Stress in NAFLD : Role of Nutrients and Food Contaminants. *Biomolecules*. 2020;10(12).
44. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;152:116–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
45. Gonzalez A, Huerta-salgado C, Orozco-aguilar J, Aguirre F, Tacchi F, Simon F, et al. Role of Oxidative Stress in Hepatic and Extrahepatic

- Dysfunctions during Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
46. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2021 Jan;209:112891. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523420308631>
 47. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2021 Sep 30;20(9):689–709. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00233-1>
 48. Gabbia D, Cannella L, Martin S De. The Role of Oxidative Stress in NAFLD – NASH – HCC Transition — Focus on NADPH Oxidases. *Biomedicines*. 2021;9(687):1–14.
 49. Bayarsaikhan G, Bayarsaikhan D, Lee J, Lee B. Targeting Scavenger Receptors in Inflammatory Disorders and Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2022;11(5):1–21.
 50. Hong T, Chen Y, Li X, Lu Y. The Role and Mechanism of Oxidative Stress and Nuclear Receptors in the Development of NAFLD. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;
 51. Arroyave-ospina JC, Wu Z, Geng Y, Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants*. 2021;10(174):1–24.
 52. Pafili K, Roden M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Mol Metab*. 2021;50(November 2020):1–20.
 53. Brunt EM, Wong VWS, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1(December):1–22.
 54. Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Molecular Mechanisms and New Treatment Strategies for Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Apr 29;15(5):7352–79. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/5/7352>
 55. Im YR, Hunter H, Gracia Hahn D, Duret A, Cheah Q, Dong J, et al. A Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD. *Hepatology* [Internet]. 2021 Oct 17;74(4):1884–901. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.31897>
 56. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* [Internet]. 2016 Sep;65(3):579–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827816301908>

57. Dowman JK, Hopkins LJ, Reynolds GM, Nikolaou N, Armstrong MJ, Shaw JC, et al. Development of Hepatocellular Carcinoma in a Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by Use of a High-Fat/Fructose Diet and Sedentary Lifestyle. *Am J Pathol* [Internet]. 2014 May;184(5):1550–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944014001096>
58. Salvoza N, Giraudi PJ, Tiribelli C, Rosso N. Natural Compounds for Counteracting Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Advantages and Limitations of the Suggested Candidates. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5).
59. Zhang C, Yang M. Current options and future directions for nafld and nash treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
60. Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules*. 2022;12(6).
61. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matić A, Kozina N, Mihaljević Z, et al. Carnosine, small but mighty—prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants*. 2021;10(7).
62. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803–45.
63. Xing L, Chee ME, Zhang H, Zhang W, Mine Y. Carnosine—a natural bioactive dipeptide: bioaccessibility, bioavailability and health benefits. *J Food Bioact*. 2019;5:8–17.
64. Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(1):30–9.
65. Brosnan ME, Brosnan JT. Histidine Metabolism and Function. *J Nutr* [Internet]. 2020 Oct 1;150(Supplement_1):2570S-2575S. Available from: https://academic.oup.com/jn/article/150/Supplement_1/2570S/5913284
66. Caruso G. Unveiling the Hidden Therapeutic Potential of Carnosine, a Molecule with a Multimodal Mechanism of Action: A Position Paper. *Molecules* [Internet]. 2022 May 20;27(10):3303. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/10/3303>
67. Lopachev A V, Abaimov DA, Filimonov IS, Kulichenkova KN, Fedorova TN. An assessment of the transport mechanism and intraneuronal stability of L-carnosine. *Amino Acids* [Internet]. 2022;54(8):1115–22. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03094-5>
68. Wang X, Chen Y, Wang Y, Wang B, Zhang J, Jian X. Expression, Regulation, and Role of an Oligopeptide Transporter: PEPT1 in Tumors. *Curr Med Chem*. 2022;29(2):1596–605.
69. Perim P, Marticorena FM, Ribeiro F, Barreto G, Gobbi N, Kerkick C, et al. Can the Skeletal Muscle Carnosine Response to Beta-Alanine Supplementation Be Optimized? *Front Nutr*. 2019;6:1–10.
70. Saunders B, De Salles Painelli V, De Oliveira LF, Da Eira Silva V, Da Silva RP, Riani L, et al. Twenty-four Weeks of β -Alanine Supplementation on Carnosine Content, Related Genes, and Exercise. *Med Sci Sports*

Exerc. 2017;49(5):896–906.

71. Matthews JJ, Artioli GG, Turner MD, Sale C. The Physiological Roles of Carnosine and β -Alanine in Exercising Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 2019;51(10):2098–108.
72. Wu G. Important roles of dietary taurine , creatine , carnosine , anserine and 4 - hydroxyproline in human nutrition and health [Internet]. Vol. 52, *Amino Acids*. Springer Vienna; 2020. 329–360 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02823-6>
73. Solana-manrique C, Sanz FJ, Martínez-Carrión G, Paricio N. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Carnosine: Therapeutic Implications in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants.* 2022;11:1–17.
74. Bermúdez M-L, Seroogy KB, Genter MB. Evaluation of Carnosine Intervention in the Thy1-aSyn Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience* [Internet]. 2019 Jul;411:270–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452219303495>
75. Ihara H, Kakihana Y, Yamakage A, Kai K, Shibata T, Nishida M, et al. 2-Oxo-histidine–containing dipeptides are functional oxidation products. *J Biol Chem* [Internet]. 2019;294(4):1279–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA118.006111>
76. Carroll L, Karton A, Radom L, Davies MJ, Pattison DI. Carnosine and Carcinine Derivatives Rapidly React with Hypochlorous Acid to Form Chloramines and Dichloramines. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2019 Mar 18;32(3):513–25. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.8b00363>
77. Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, et al. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res* [Internet]. 2021;55(4):321–30. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1856830>
78. Zhao K, Li Y, Wang Z, Han N, Wang Y. Carnosine Protects Mouse Podocytes from High Glucose Induced Apoptosis through PI3K/AKT and Nrf2 Pathways. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 May 28;2019:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/4348973/>
79. Chmielewska K, Dzierzbicka K, Inkielewicz-Stępnia I, Przybyłowska M. Therapeutic Potential of Carnosine and Its Derivatives in the Treatment of Human Diseases. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2020 Jul 20;33(7):1561–78. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.0c00010>
80. Zhao J, Posa DK, Kumar V, Hoetker D, Kumar A, Ganesan S, et al. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids* [Internet]. 2019 Jan 17;51(1):123–38. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-018-2676-6>
81. Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, et al. Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and

- Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 10;7(1):44492. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep44492>
82. Al-Sawalha NA, Alshogran OY, Awawdeh MS, Almomani BA. The effects of L-Carnosine on development of metabolic syndrome in rats. *Life Sci*. 2019;237(September).
 83. Mong MC, Chao CY, Yin MC. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2011;653(1–3):82–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.001>
 84. Schwank-Xu C, Forsberg E, Bentinger M, Zhao A, Ansurudeen I, Dallner G, et al. L-Carnosine Stimulation of Coenzyme Q10 Biosynthesis Promotes Improved Mitochondrial Function and Decreases Hepatic Steatosis in Diabetic Conditions. *Antioxidants* [Internet]. 2021 May 17;10(5):793. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/793>

Capítulo II
Artigo Científico

**Efeitos da suplementação de carnosina sobre processos
fisiopatológicos da doença hepática gordurosa associada às
alterações metabólicas induzida em ratos por dieta**

Núbia Alves Grandini¹; Mariane Róvero Costa¹; Cristina Schmitt Gregolin¹;
Gabriela Souza Barbosa²; Guilherme Ribeiro Romualdo¹; Artur Junio
Togneri Ferron³; Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron³; Ana Lúcia dos
Anjos Ferreira¹; Giancarlo Aldini⁴; Camila Renata Corrêa¹; Fernando
Moreto¹

¹Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

²Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

³Faculdades Integradas de Bauru (FIB)

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Milão

Resumo

O alto consumo de dietas ricas em açúcar e gordura está relacionado ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas (MAFLD). A carnosina (CAR) é um dipeptídeo, que possui ação antioxidante e anti-inflamatória, e vem sendo estudada para o tratamento e prevenção de doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação de CAR sobre a MAFLD induzida por dieta em ratos. Assim, 24 ratos *Wistar* machos foram distribuídos em 2 grupos para indução da MAFLD: um grupo recebeu dieta normocalórica (n=12) e o outro recebeu dieta hipercalórica rica em lipídeos e carboidratos simples (n=12). Após 17 semanas os animais foram redistribuídos para o tratamento (4 semanas): grupo controle (Co, n=6), grupo controle suplementado com CAR (Co+CAR, n=6), grupo MAFLD (MAFLD, n=6) e grupo MAFLD suplementado com CAR (MAFLD+CAR, n=6). A CAR foi administrada na dose de 250mg/kg/dia, por via intraperitoneal. O grupo MAFLD apresentou maior índice de adiposidade, pressão arterial sistólica, glicemia, IPGTT (*Intraperitoneal Glucose Tolerance Test*), triglicerídeos e colesterol plasmáticos e hepáticos, insulina, HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), bem como esteatose hepática, AOPP

(*Advanced Oxidation Protein Products*) plasmática e hepática, e PPAR- α (*Peroxisome Proliferator-activated receptor α*) em comparação ao grupo Co. A CAR atenuou os níveis de triglicerídeos e colesterol plasmáticos e hepáticos, IPGTT, esteatose hepática, macrófagos CD68+ e AOPP plasmática e hepática, além de aumentar os níveis de colesterol HDL e PPAR- α em comparação ao grupo MAFLD não tratado. A CAR atuou em importantes processos fisiopatológicos da MAFLD, podendo ser um composto terapêutico para o controle da doença.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas, carnosina, obesidade, dieta hipercalórica.

Abstract

Consumption of diets high in sugar and fat is related to the development of Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). Carnosine (CAR) is a dipeptide with antioxidant and anti-inflammatory action and has been studied for treating and preventing diseases. This work aimed to evaluate the effects of CAR supplementation on diet-induced MAFLD in rats. For this, 24 male Wistar rats were distributed into two groups for MAFLD induction: one group received a normocaloric diet (n=12), and the other received a hypercaloric diet rich in lipids and simple carbohydrates (n=12). After 17 weeks, the animals were redistributed for treatment (4 weeks): control group (Co,n=6), control group supplemented with CAR (Co+CAR, n=6), MAFLD group (MAFLD, n=6), and MAFLD group supplemented with CAR (MAFLD+CAR, n=6). CAR was administered intraperitoneally at a dose of 250mg/kg/day. The MAFLD group had a higher adiposity index, systolic blood pressure, blood glucose, IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test), plasma and liver triglycerides and cholesterol, insulin, HOMA (Homeostasis Model Assessment), as well as hepatic steatosis, plasma and hepatic AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), and PPAR- α (Peroxisome Proliferator-activated receptor α), compared to the Co. CAR attenuated plasma and hepatic triglyceride and cholesterol levels, IPGTT, hepatic steatosis, CD68+ macrophages, and plasma and hepatic AOPP, in addition to increasing HDL cholesterol levels and PPAR- α , compared to the untreated MAFLD group. CAR attenuates important

pathophysiological processes of MAFLD and may be a therapeutic compound to control the disease.

Keywords: Metabolic-associated fatty liver disease, carnosine, obesity, hypercaloric diet.

1. Introdução

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a lesão no fígado mais comum, que afeta cerca de um terço da população mundial e é definida pelo acúmulo de gordura no tecido hepático, na ausência do consumo de álcool e de outras lesões hepáticas (1). Em 2020, foi proposta uma nova terminologia e definição, uma vez que a DHGNA pode existir na presença de outras doenças hepáticas e está associada principalmente às disfunções metabólicas, passando a ser chamada de doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas (MAFLD, do inglês *Metabolic-associated fatty liver disease*). Sendo assim, a MAFLD é baseada na presença de esteatose hepática com uma das três características a seguir: sobrepeso ou obesidade; diabetes mellitus tipo 2; ou peso normal com evidência de desregulação metabólica (2,3).

A MAFLD possui um espectro de evolução que vai desde a esteatose simples, podendo evoluir para a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e até mesmo para o câncer hepático (4,5). De acordo com uma pesquisa realizada a partir de dados da Europa, América do norte e Ásia, a prevalência de pacientes com MAFLD é de cerca de 39% (6), enquanto a EHNA atinge cerca de 5% da população mundial (1). Sua patogenia ainda não está bem definida, porém há duas teorias para o seu desenvolvimento: a primeira é a teoria “*two hits*”, onde acredita-se que a primeira agressão é o desequilíbrio causado pela resistência insulínica (RI) entre as vias hepáticas de aquisição e eliminação dos lipídios, e o segundo ataque envolve os processos de inflamação e oxidação (7). A segunda teoria, é de que seu desenvolvimento se dá a partir de um modelo “*multiple hits*”, onde são vários os agentes agressores que desencadeiam essa lesão, sendo eles de ordem genética, epigenética, nutricional, e inflamatória, incluindo alterações na microbiota, RI e estresse oxidativo (8,9).

A dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gorduras, é um importante fator precursor da MAFLD, podendo causar efeitos negativos no fígado, através do acúmulo destes macronutrientes (10,11). Dados na literatura apontam que mulheres que consomem uma dieta rica em açúcar e gordura, possuem 119% maior risco (OR, 2.19; 95% CI, 1.40–3.46) de desenvolver a doença hepática gordurosa (12); dados semelhantes foram encontrados para adolescentes na faixa dos 17 anos que tiveram o mesmo padrão de consumo de dieta ocidental (13). O acúmulo de ácidos graxos no fígado gera a esteatose hepática e favorece a produção excessiva de EROs (espécies reativas de oxigênio), causando um desequilíbrio no sistema antioxidante e consequentemente estresse oxidativo, podendo causar diversos danos celulares (14,15).

Diante da complexidade da MAFLD e de suas consequências, a busca por formas de prevenção e tratamento se faz necessária. Atualmente ainda não há um tratamento farmacológico específico para essa doença, são utilizados apenas medicamentos que tratem alterações metabólicas específicas, como a dislipidemia e a hiperglicemia (16,17). Por outro lado, emerge a busca por compostos bioativos que possam ser utilizados para melhorar essas condições e um desses compostos é a carnosina (CAR), um dipeptídeo natural, composto por β -alanina e L-histidina, que pode ser encontrado no organismo humano em maiores concentrações no músculo esquelético e no cérebro (18).

Durante muitos anos a CAR foi o foco de estudos apenas relacionados a melhora da performance de exercícios físicos, principalmente devido a sua capacidade tamponante nos músculos (19). Porém, a CAR tem sido apontada como um potencial agente terapêutico no tratamento de doenças, principalmente devido a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e de sequestrar EROs (20). Há estudos que demonstraram que a CAR foi capaz de atenuar o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 em camundongos ob/ob (21), melhorar os parâmetros relacionados a síndrome metabólica induzidos por dieta em ratos *Wistar* (22), bem como melhorar a esteatose hepática em camundongos que consumiram uma dieta rica em gordura (23) e em um modelo de diabetes tipo 2 em camundongos db/db (24).

Diante da necessidade de esclarecer os efeitos biológicos da CAR e a escassez de estudos relacionando este dipeptídeo com a MAFLD, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de CAR sobre a MAFLD induzida por dieta em ratos.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e Protocolo Experimental

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA nº. 1322/2019) e foi realizado de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “*U.S. National Institutes of Health*”. 24 ratos *Wistar* machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, com aproximadamente 21 dias de vida, foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12h) controladas. Inicialmente foram distribuídos em dois grupos experimentais, alimentados com diferentes dietas para indução da MAFLD: normocalórica ($n=12$) e hipercalórica rica em açúcar e gordura ($n=12$). Na 17ª semana, após a diferença entre os triglicerídeos plasmáticos, definido como critério de inclusão, os animais foram redistribuídos em quatro grupos para o tratamento: um grupo controle que continuou recebendo dieta normocalórica (Co, $n=6$), um grupo controle que recebeu dieta normocalórica suplementado com carnosina (Co+CAR, $n=6$), um grupo que continuou recebendo dieta hipercalórica (MAFLD, $n=6$) e um grupo que recebeu dieta hipercalórica suplementado com carnosina (MAFLD+CAR, $n=6$). As rações e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os grupos que receberam a dieta hipercalórica também receberam sacarose na água de beber numa concentração de 25% durante todo o experimento. Ambas as rações foram produzidas de acordo com Francisqueti *et al.* (2017) (25). Os grupos receberam a suplementação de CAR (250 mg/kg/dia) ou veículo (solução fisiológica estéril, NaCl 0,9%) por via intraperitoneal durante 4 semanas. Assim, somando-se os períodos de indução e tratamento, o experimento teve duração total de 21 semanas (Figura 7).

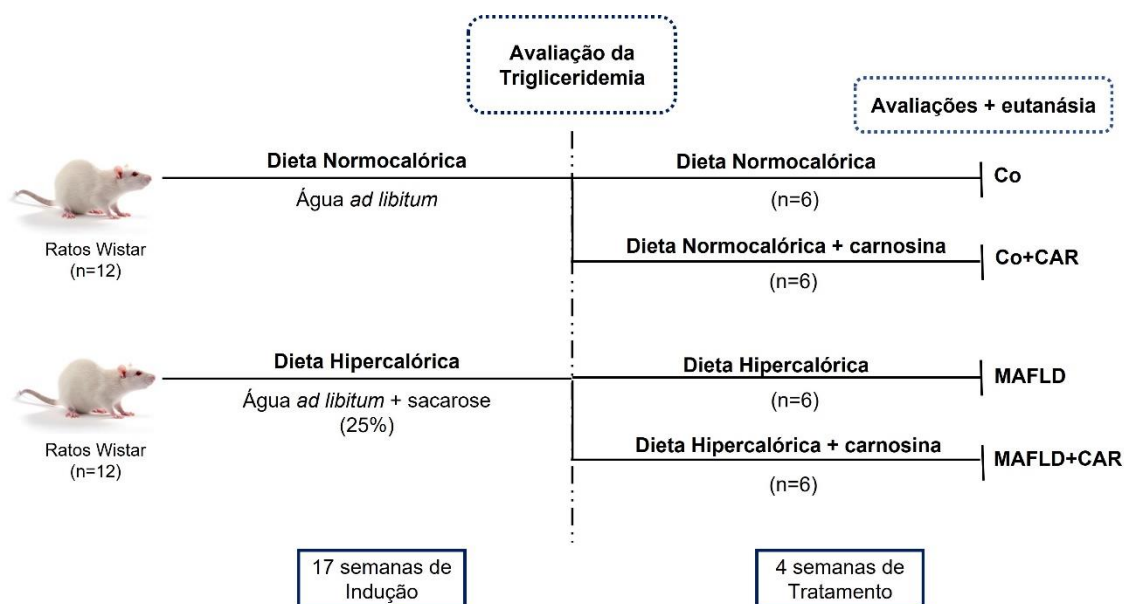


Figura 7. Representação esquemática do protocolo experimental. O experimento teve duração total de 21 semanas. Co: grupo Controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina. Elaborado pelo autor.

2.2. Suplementação de Carnosina

A CAR (L-carnosina) foi administrada por via intraperitoneal (250mg/kg) durante 4 semanas após o período de indução. A dose foi definida a partir de resultados de estudos, onde a CAR apresentou resultados eficazes e não gerou efeitos tóxicos e/ou adversos aos animais (26,27). A infusão foi realizada utilizando agulha 30G sendo injetado volume líquido próximo de 500uL. Foi utilizado o produto CarnoPure™ (Flamma S.p.A., Chignolo d'Isola, Bergamo, Itália), o qual é exclusivo para experimentos científicos e utilizado em estudos no exterior. Este produto foi gentilmente fornecido por esta empresa, sem custos, para realização deste experimento.

2.3. Eutanásia

Ao término das 21 semanas, os animais ficaram 8h em jejum e então foram anestesiados (tiopental 120 mg/kg/i.p.) e eutanasiados por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas em tubos Falcon® contendo o anticoagulante EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*), centrifugadas (3000 rpm a 4°C por 10 minutos, Eppendorf® Centrifuge 5804-R,

Hamburg, Alemanha) e o plasma armazenado em freezer a -80°C. O tecido adiposo foi dissecado e pesado para a avaliação dos parâmetros nutricionais. O fígado foi fracionado em alíquotas para as análises histológicas ou armazenado em freezer a -80°C até a realização das outras análises.

2.4. Caracterização Nutricional e da Obesidade

A caracterização nutricional foi avaliada a partir do consumo de ração, consumo hídrico e do consumo calórico (ração e água). A ingestão alimentar e hídrica foi calculada diariamente a partir das sobras individuais de cada animal. A ingestão calórica foi calculada através da ingestão alimentar, multiplicada pelo valor energético de cada dieta. A caracterização da obesidade foi baseada no ganho de peso e no índice de adiposidade. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial dos animais [ganho de peso (g) = peso final (g) – peso inicial (g)]. O índice de adiposidade representa a relação entre o somatório dos depósitos de gordura (visceral, epididimal e retroperitoneal) e o peso final dos animais (índice de adiposidade = somatório depósito de gordura (g) / peso final (g) x 100) (28).

2.5. Pressão Arterial Sistólica

A Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi aferida pelo método indireto de pletismografia de cauda, utilizando-se esfigmomanômetro elétrico *Narco Bio-System®* PE 300, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, Houston, TX, EUA). Para tanto, os animais foram mantidos durante 5 minutos em uma caixa de madeira climatizada entre 38 e 40°C, para estimular a vasodilatação arterial. Após, o manguito foi preso a cauda de cada animal e insuflado (200mmHg) e esvaziado, permitindo o registro das pulsações arteriais coletadas em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, EUA). A média de três leituras de PAS foi registrada para cada animal (29).

2.6. Análise Bioquímica e Hormonal

A determinação da glicose foi realizada por glicosímetro (Accu-Check Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). As concentrações de ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos, colesterol total e suas frações, colesterol

HDL e colesterol não-HDL (n-HDL) foram analisadas pelo método colorimétrico enzimático com kits comerciais (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brasil) em equipamento bioquímico automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

O nível de insulina foi mensurado através do método de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando kits comerciais (Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Bridge International Inc.) e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas Spectramax 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A avaliação da RI foi realizada por meio do índice modelo de homeostase (HOMA-IR, do inglês *Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) utilizando-se os parâmetros glicemia e insulina plasmática. O cálculo do índice HOMA-IR obedeceu a seguinte fórmula: $\text{insulina } (\mu\text{UI/ml}) \times \text{glicemia } (\text{mmol/L}) / 22,5$ (4).

O Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (IPGTT, do inglês *intraperitoneal glucose tolerance test*) ocorreu na 17ª e 21ª semana (pré-suplementação e pós-suplementação, respectivamente). Foi realizada uma infusão intraperitoneal de 1g de glicose por kg de massa corporal do animal após jejum de 6h, seguido de mensurações das concentrações sanguíneas de glicose. A glicose sanguínea foi mensurada antes da infusão e 30, 60, 90 e 120 minutos após (30). A glicemia foi aferida por equipamento portátil (Accu-Check Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA) e respectivas fitas de quantificação.

2.7. Análises do Tecido Hepático

2.7.1. Parâmetros Histológicos

O tecido hepático foi armazenado, após a coleta, em paraformaldeído 4% com 0,1M de tampão de fosfato (pH=7,4) durante as primeiras 24 horas. Após, o tecido foi transferido para o álcool etílico e as amostras emblocadas em parafina para obtenção de cortes de 5 µm de espessura. Tais cortes (um por animal) foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE) e avaliados quanto à esteatose, levando em consideração os aspectos macro e microvesicular, de acordo com o parâmetro *NAFLD Activity Score* (NAS) (31). Em seguida, foram selecionados 10 campos aleatoriamente (objetiva 20×), que foram avaliados

em cada secção e os seguintes scores foram considerados: 0 (<5% do campo microscópico), 1 (5-33%), 2 (33-66%) ou 3 (>66%). Outras amostras hepáticas foram congeladas, incluídas em meio *Optimal Cutting Temperature* (Tissue-Trek, EUA) e secções de 10 µm foram obtidas e coradas com Oil red (Sigma Aldrich, EUA) para obtenção de fotos representativas.

2.7.2. Imunoistoquímica para CD68

Outras secções de fígado de 5 µm de espessura foram submetidas à recuperação de antígeno em tampão citrato 0,01 M (pH 6,0, 120°C, 5 min.) em câmara de pressão Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca). Após bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 10% em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) (15 minutos), as lâminas foram tratadas com leite desnatado por 60 minutos para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, os cortes histológicos foram incubados em uma câmara úmida (4°C, *overnight*) com solução do anticorpo primário anti-CD68 (macrófagos, ab125212, diluição 1:500, Abcam, UK). Em seguida, as lâminas foram incubadas com polímero HRP (do inglês *horseradish peroxidase*) de única etapa (EasyPath - Erviegas, Brasil) (20 minutos, à temperatura ambiente). As reações foram reveladas com o cromógeno 3'3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma–Aldrich, EUA) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris. Os macrófagos CD68+ foram contados em 10 campos selecionados aleatoriamente (20×) e divididos por área de campo (mm²), utilizando o *software* Image J (NIH, EUA) (32).

2.7.3. Marcador de Estresse Oxidativo

2.7.3.1. Produtos de oxidação de proteína avançada (AOPP)

A detecção dos produtos de oxidação de proteína avançada (AOPP, do inglês *Advanced oxidation protein products*) foi realizada no tecido hepático e no plasma. No tecido hepático, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão PBS na razão de 1:10 (amostra:PBS). A quantificação de AOPP foi realizada através da diluição 1:5 de 200 µL da amostra (homogenato ou plasma). Foram utilizados 200 µL de Cloramina-T (0-100 µmol/L) para a curva de calibração e 200 µL de PBS como branco. Foram adicionadas as amostras 10 µL de KI (iodeto de potássio) 1,16M e 20 µL de ácido acético. A absorbância

foi lida imediatamente a 340 nm (espectrofotômetro Multiskan Ascent, Labsystems, Vantaa, Finlândia). A concentração final de AOPP é expressa em unidades de cloramina ($\mu\text{mol/L}$) e o resultado no tecido hepático corrigido pela quantidade de proteína (33).

2.7.4. Níveis Hepáticos de Triglicerídeos e Colesterol

Os níveis intracelulares de triglicerídeos e colesterol hepáticos foram determinados por método colorimétrico (Kit de ensaio colorimétrico de triglicerídeos e colesterol; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Os resultados foram corrigidos pela quantidade de tecido (4).

2.8. Expressão gênica do PPAR- α

A expressão gênica do PPAR- α (do inglês *Peroxisome Proliferator-activated receptor α*) foi realizada a partir de PCR (reação em cadeia de polimerase) em tempo real. O RNA (ácido ribonucleico) total foi extraído do tecido hepático utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. O RNA foi submetido a transcrição reversa para a conversão em cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) (Kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade, Applied Biosystems, CA, EUA). O cDNA foi usado no kit de PCR em tempo real (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems, Foster City CA, EUA) para avaliar a expressão do PPAR- α .

2.9. Análises Estatísticas

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por ANOVA *two way* e os dados foram submetidos ao teste post-hoc de Tukey para comparar todos os grupos. Os dados do IPGTT estão expressos em média $\pm$ desvio padrão e os dados foram avaliados por ANOVA *one way*, seguido com teste post-hoc de Tukey. Os parâmetros histológicos são expressos em mediana e foi utilizado Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Plot 12.0 versão para Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). Foi considerado um valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Caracterização Nutricional e da Obesidade

A caracterização nutricional é apresentada na Figura 8. É possível observar que os grupos MAFLD e MAFLD+CAR apresentaram menor consumo alimentar, maior consumo hídrico e calórico quando comparados aos grupos Co e Co+CAR, respectivamente.

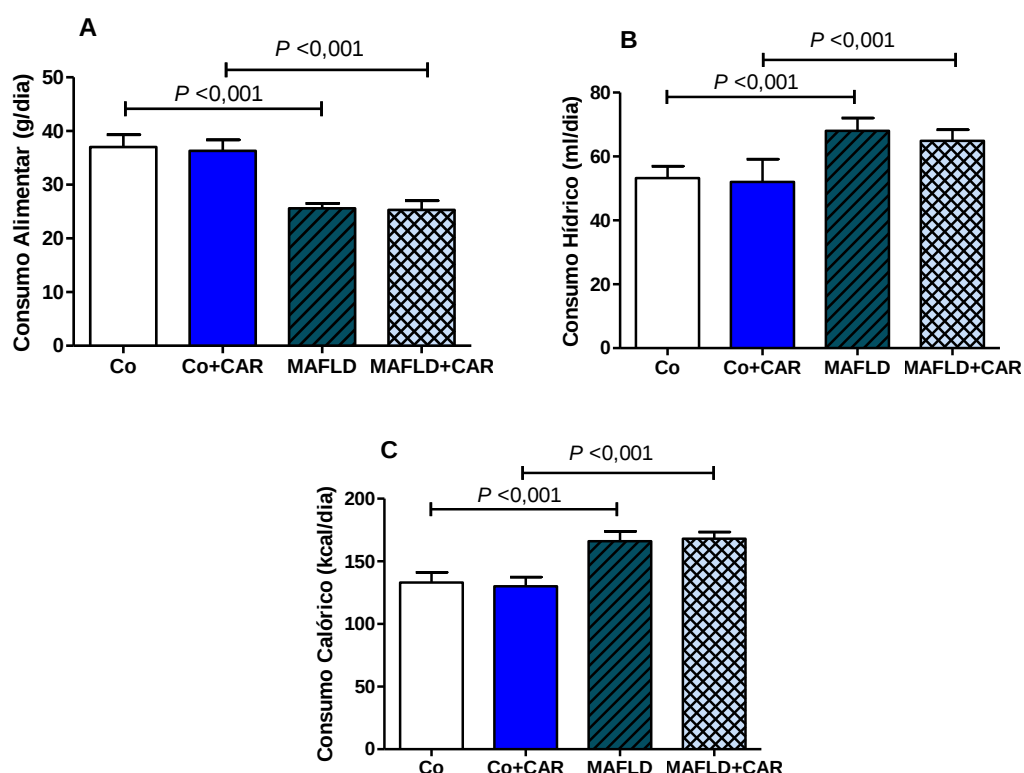


Figura 8. Caracterização Nutricional. A) Consumo alimentar (g/dia); B) Consumo hídrico (ml/dia); C) Consumo calórico (kcal/dia). Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

A Tabela 1 apresenta os dados de Peso e obesidade. Não houve diferença para o peso corporal inicial entre os grupos. O grupo MAFLD apresentou um maior peso final quando comparado ao grupo Co. Os grupos MAFLD e MAFLD+CAR apresentaram maior ganho de peso quando comparados aos grupos Co e Co+CAR, respectivamente. A presença da obesidade foi determinada pelo índice de adiposidade. Pode-se observar que os grupos de indução a MAFLD (MAFLD e

MAFLD+CAR) apresentaram maiores índices de adiposidade quando comparados aos grupos controles (Co e Co+CAR, respectivamente).

Tabela 1. Características de Peso e Obesidade.

	Grupos				Efeitos		
	Co	Co+CAR	MAFLD	MAFLD+CAR	Dieta	CAR	Interações
Peso corporal inicial (g)	324 ± 25,0	324 ± 26,8	320 ± 16,4	314 ± 27,1	0,450	0,775	0,753
Peso corporal final (g)	502 ± 57,2	477 ± 25,8	569 ± 38,0*	530 ± 68,5	0,008	0,133	0,743
Ganho de Peso (g)	145 ± 48,9	137 ± 23,2	250 ± 34,6*	198 ± 48,6†	<0,001	0,085	0,201
Índice de Adiposidade (%)	4,15 ± 1,60	3,12 ± 1,11	8,51 ± 1,03*	7,68 ± 2,56†	<0,001	0,190	0,883

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina. * vs Co; † vs Co+CAR.

3.2. Pressão Arterial Sistólica

A Figura 9 apresenta os níveis de Pressão Arterial Sistólica. O grupo MAFLD apresentou maior PAS em relação ao grupo Co.

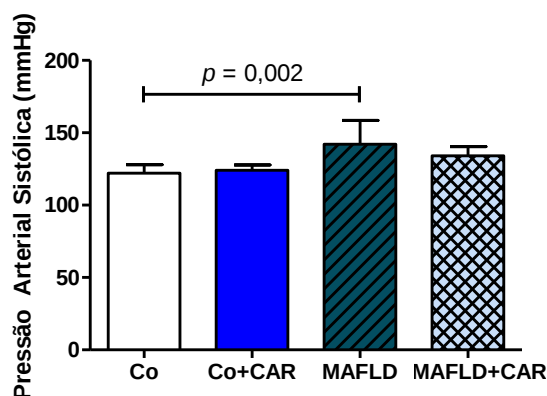


Figura 9. Níveis de Pressão Arterial Sistólica. Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

3.3. Análise Bioquímica e Hormonal

Na Tabela 2 estão representados os marcadores bioquímicos e hormonais. O grupo Co+CAR apresentou menores níveis de alanina aminotransferase (ALT) quando comparado ao grupo Co. Os grupos MAFLD e MAFLD+CAR apresentaram menores níveis de ureia quando comparados aos

grupos Co e Co+CAR, respectivamente. Não houve diferença significativa para aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico e creatinina. Os grupos MAFLD e MAFLD+CAR apresentaram maiores valores de insulina e HOMA-IR quando comparados aos grupos Co e Co+CAR, respectivamente.

Tabela 2. Marcadores Bioquímicos e Hormonais.

	Grupos				Efeitos		
	Co	Co+CAR	MAFLD	MAFLD+CAR	Dieta	CAR	Interações
AST (U/L)	155 ± 34,3	125 ± 18,6	114 ± 21,0	130 ± 32,4	0,128	0,532	0,058
ALT (U/L)	104 ± 14,4	69,5 ± 16,1*	83,0 ± 26,5	87,5 ± 21,5	0,858	0,084	0,028
Ácido úrico (mg/dL)	0,967 ± 0,175	0,800 ± 0,420	1,27 ± 0,761	1,67 ± 1,69	0,150	0,768	0,476
Ureia (mg/dL)	58,8 ± 8,66	61,0 ± 9,63	35,0 ± 15,5*	44,2 ± 4,58†	<0,001	0,195	0,417
Creatinina (mg/dL)	4,48 ± 3,08	4,59 ± 5,01	4,48 ± 1,68	4,36 ± 0,985	0,931	0,998	0,93
Insulina (ng/mL)	0,224 ± 0,031	0,175 ± 0,039	0,306 ± 0,039*	0,293 ± 0,073†	<0,001	0,132	0,379
HOMA - IR	1,24 ± 0,199	1,07 ± 0,227	1,93 ± 0,304*	2,03 ± 0,535†	<0,001	0,8	0,342

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; HOMA-IR: homeostasis model assessment – insulin resistance. * vs Co; † vs Co+CAR.

Na Tabela 3 estão expressos os marcadores relacionados ao metabolismo de lipídios e carboidratos. Os grupos indução a MAFLD (MAFLD e MAFLD+CAR) apresentaram maiores níveis de glicemia quando comparados aos grupos controle (Co e Co+CAR, respectivamente). Co+CAR apresentou menores concentrações de Colesterol total comparado ao grupo Co, enquanto MAFLD+CAR apresentou maiores concentrações de Colesterol total comparado ao grupo Co+CAR. Com relação aos triglicerídeos, os grupos MAFLD e Co+CAR apresentaram maiores e menores concentrações, respectivamente, quando comparado ao grupo Co, enquanto o grupo MAFLD+CAR apresentou menores e maiores níveis quando comparado aos grupos Ob e Co+CAR, respectivamente. Em adição, o grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis de colesterol HDL (do inglês *high density lipoprotein*) comparado ao grupo MAFLD. Não houve diferença estatística para os níveis de colesterol não-HDL.

Tabela 3. Marcadores do Metabolismo de Lipídios e Glicose.

	Grupos				Efeitos		
	Co	Co + CAR	MAFLD	MAFLD+CAR	Dieta	CAR	Interações
Glicemia (mg/dL)	78,0 ± 8,29	86,3 ± 11,4	88,8 ± 6,74*	97,3 ± 4,50†	0,004	0,020	0,980
Colesterol Total (mg/dL)	62,3 ± 7,12	46,5 ± 10,1*	52,7 ± 9,63	62,0 ± 8,32†	0,430	0,38	0,002
Triglicerídeos (mg/dL)	70,4 ± 16,9	41,0 ± 8,32*	205 ± 34,6*	112 ± 27,4 ^{#†}	<0,001	<0,001	0,004
HDL (mg/dL)	14,5 ± 3,02	14,0 ± 1,79	11,4 ± 2,33	15,5 ± 3,27 [#]	0,471	0,114	0,047
n-HDL (mg/dL)	47,8 ± 4,67	40,5 ± 10,9	40,2 ± 6,59	46,5 ± 5,79	0,785	0,870	0,035

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina; HDL: high density lipoprotein; n-HDL: non-high density lipoprotein. * vs Co; # vs MAFLD; † vs Co+CAR.

O teste de tolerância à glicose intraperitoneal pode ser observado na Figura 10. No período pré-suplementação com CAR, houve uma diferença entre o grupo MAFLD e o grupo Co após 30 min da infusão de glicose; após 90 min o grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis de glicemia em comparação aos grupos Co e Co+CAR; após 120 min de infusão, o grupo MAFLD apresentou maiores níveis de glicemia com relação ao grupo Co e o grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis em comparação aos grupos Co e Co+CAR (Figura 10A). No período pós suplementação com CAR, após 30 min de infusão da glicose, o grupo MAFLD apresentou maiores níveis de glicemia com relação aos grupos Co e MAFLD+CAR; após 60 e 90 min de infusão, o grupo MAFLD apresentou maiores níveis em comparação ao grupo Co; após 120 min de infusão, os grupos MAFLD e MAFLD+CAR apresentaram maiores níveis glicêmicos em comparação aos grupos Co e Co+CAR, respectivamente, e o grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis de glicemia em comparação ao grupo Co (Figura 10B). O grupo MAFLD apresentou níveis significantemente maiores de AUC (do inglês *Area under the curve*) em comparação ao grupo Co antes e após a suplementação (Figura 10C). O grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis de AUC em comparação ao grupo Co+CAR antes e após a suplementação, porém apresentou níveis menores em comparação ao grupo MAFLD, após a suplementação, com numa redução significativa de aproximadamente 18%.

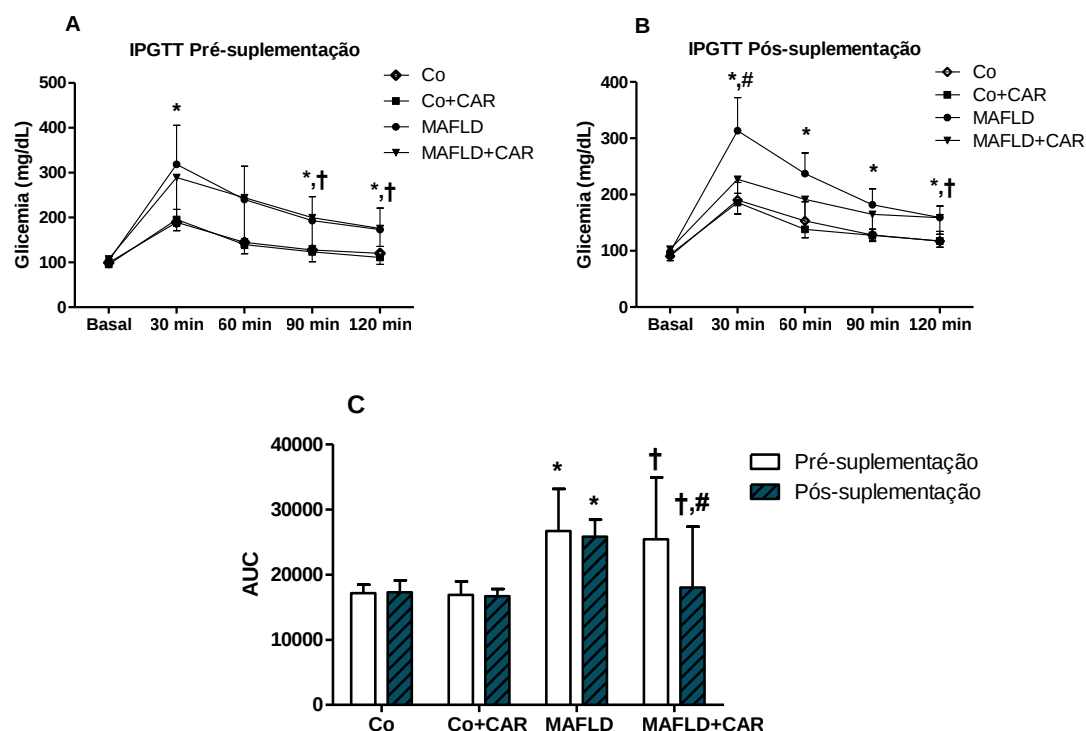


Figura 10. Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (IPGTT). A) IPGTT Pré-suplementação; B) IPGTT Pós-suplementação; C) Área abaixo da curva (AUC, do inglês Area under the curve). Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA one way e two way com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina. * vs Co; † vs Co+CAR; # vs MAFLD.

3.4. Análises do Tecido Hepático

3.4.1. Parâmetros Histológicos

A Figura 11 mostra a determinação da esteatose hepática por parâmetros histológicos. É possível notar que o grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina (MAFLD+CAR) atenuou a esteatose com aspectos macro e microvesicular, desenvolvida pelo grupo indução a MAFLD não tratado (MAFLD).

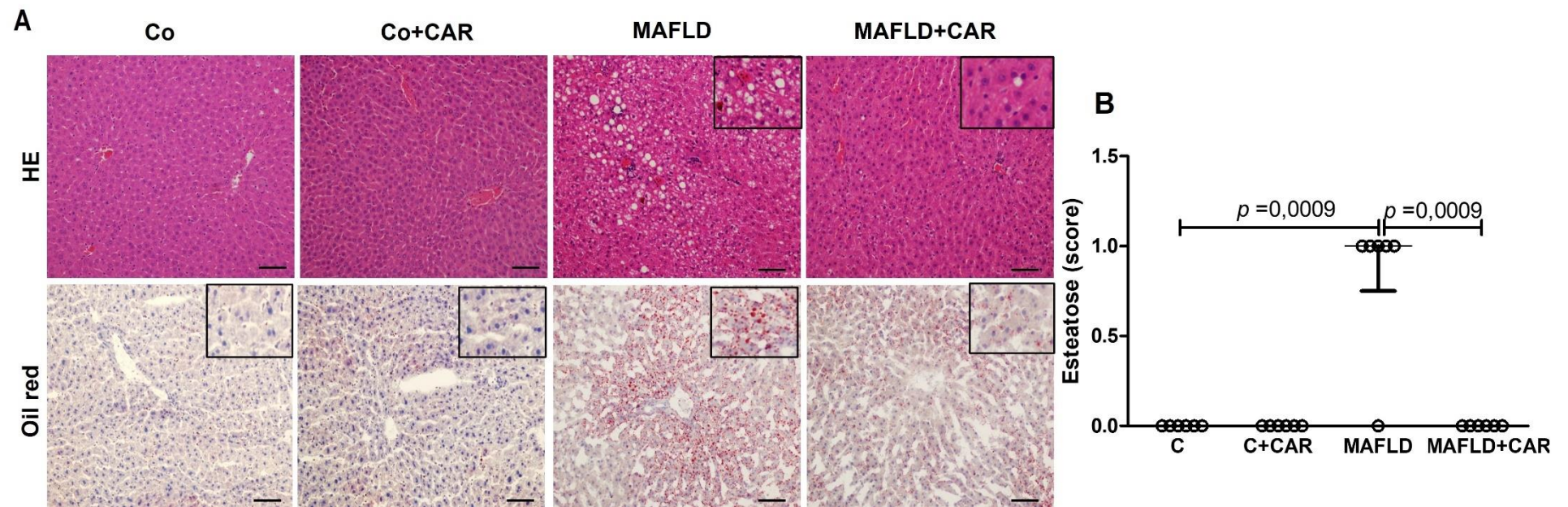


Figura 11. Determinação de esteatose hepática por parâmetros histológicos. A) Fotomicrografias representativas de cortes hepáticos corados com HE e Oil red (barra de escala: 50 μ m). B) Score Esteatose. Os dados estão apresentados em mediana (max – min) e pontos de dados individuais, e foram analisados por Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo; $n = 6$ animais/grupo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

3.4.2. Imunoistoquímica para CD68+

Na Figura 12 estão apresentados os efeitos da suplementação de CAR na densidade de macrófagos CD68+. É possível notar que a densidade de macrófagos é menor no grupo MAFLD+CAR em comparação ao grupo MAFLD, apontando para uma atenuação da inflamação gerada pela CAR.

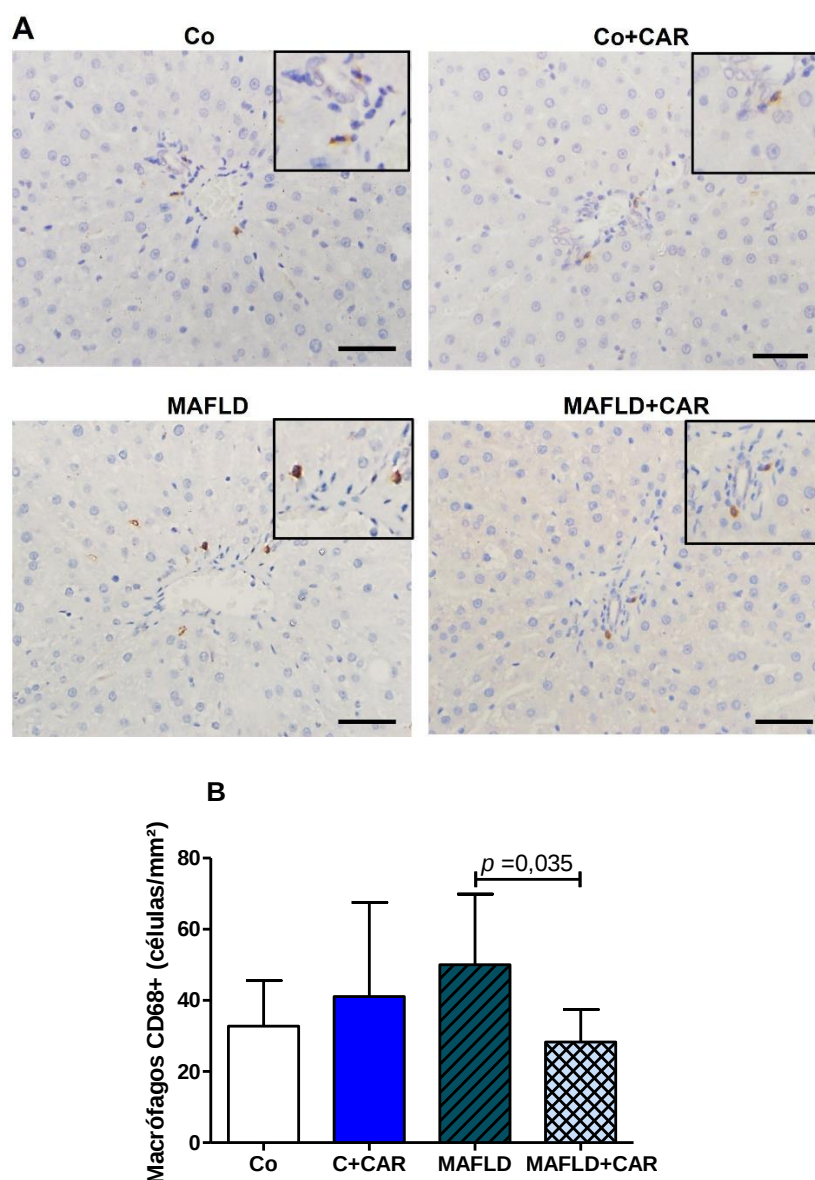


Figura 12. Efeitos da suplementação de CAR na densidade de macrófagos CD68+. A) Fotomicrografias representativas de cortes hepáticos imunocorados (detalhes, barra de escala: 100 μ m). B) Análise semiquantitativa. Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão e pontos de dados individuais, e foram analisados por ANOVA two way com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo; $n = 5$ animais/grupo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

3.4.3. Marcador de Estresse Oxidativo

3.4.3.1. Produtos de oxidação de proteína avançada (AOPP)

Na Figura 13 estão apresentados níveis de AOPP no tecido hepático e no plasma. O grupo MAFLD apresentou níveis plasmáticos maiores de AOPP em comparação ao grupo Co e em contrapartida, o grupo MAFLD+CAR atenuou os níveis de AOPP em comparação ao grupo MAFLD (Figura 13A). Os níveis hepáticos de AOPP (Figura 13B) dos grupos MAFLD e MAFLD+CAR estão elevados em comparação aos grupos Co e Co+CAR, respectivamente. Por outro lado, os grupos MAFLD+CAR e Co+CAR apresentaram uma atenuação nos níveis de AOPP no fígado, quando comparados aos grupos MAFLD e Co, respectivamente.

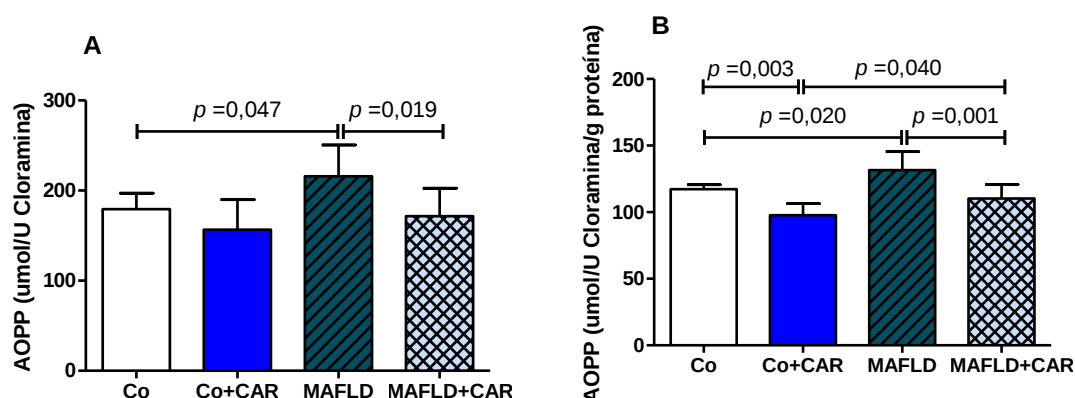


Figura 13. Marcador de Estresse Oxidativo - AOPP. A) Níveis plasmáticos de AOPP; B) Níveis hepáticos de AOPP. Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA two way com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina; AOPP: produtos de oxidação de proteína avançada.

3.4.4. Níveis Hepáticos de Triglicerídeos e Colesterol

Na Figura 14 pode-se observar os níveis hepáticos de triglicerídeos e colesterol. O grupo MAFLD apresentou maiores concentrações de triglicerídeos e colesterol no fígado quando comparado ao grupo Co. O grupo indução a MAFLD tratado com CAR (MAFLD+CAR) apresentou concentrações elevadas de triglicerídeos em relação ao grupo Co+CAR, mas atenuou os níveis hepáticos de triglicerídeos e colesterol em comparação ao grupo indução a MAFLD não tratado.

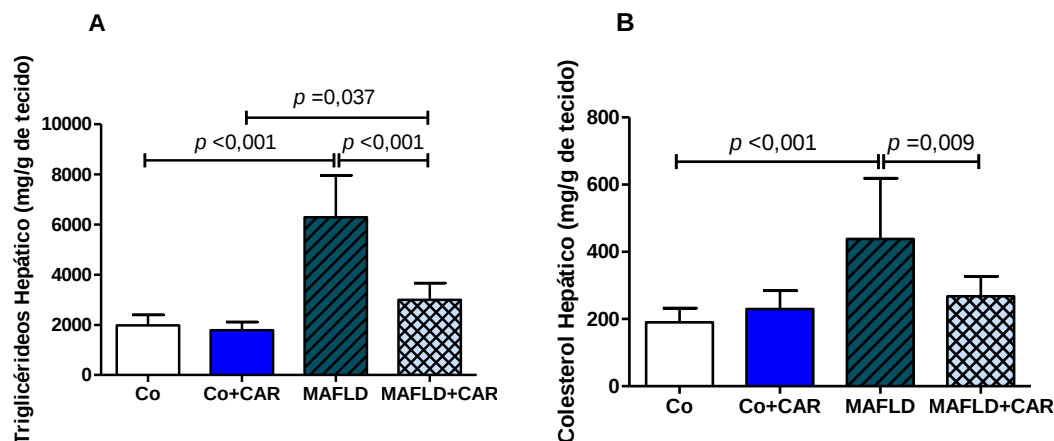


Figura 14. Níveis hepáticos de Triglicerídeos e Colesterol. A) Níveis hepáticos de triglicerídeos; B) Níveis hepáticos de colesterol. Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

3.5. Expressão gênica do PPAR- α

A Figura 15 mostra a expressão gênica por PCR em tempo real no tecido hepático. Pode-se observar que o grupo MAFLD apresentou níveis menores de mRNA em comparação ao grupo Co. Em contrapartida, o grupo MAFLD+CAR apresentou maiores níveis em comparação ao grupo MAFLD.

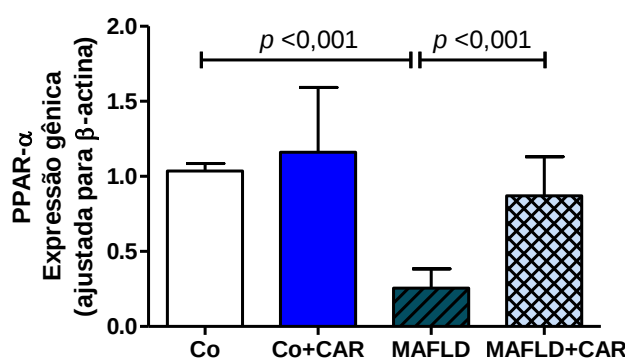


Figura 15. Expressão gênica do PPAR- α no tecido hepático. Comparação por ANOVA *two way* com teste post-hoc de Tukey. $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Co: grupo controle; Co+CAR: grupo controle suplementado com carnosina; MAFLD: grupo indução a MAFLD; MAFLD+CAR: grupo indução a MAFLD suplementado com carnosina.

4. Discussão

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da suplementação de CAR sobre a MAFLD em ratos induzida por dieta. Estudos têm demonstrado que o alto consumo de dietas ricas em açúcares e gorduras, bem como de bebidas açucaradas, favorece o desenvolvimento da MAFLD, associada a diversas alterações, como a síndrome metabólica, inflamação e principalmente o estresse oxidativo (5). Os dados encontrados em nosso trabalho corroboram com a literatura, uma vez que o grupo MAFLD apresentou obesidade, hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia, RI, assim como esteatose e alterações lipídicas no tecido hepático. Foram observados maiores consumos hídrico e calórico do grupo MAFLD, com consequente aumento no peso corporal final e ganho de peso, assim como observado em outros trabalhos semelhantes (29,34). A CAR não influenciou nos consumos alimentar, hídrico e calórico, ganho de peso e peso final dos animais do grupo indução a MAFLD tratado (MAFLD+CAR), corroborando com os dados encontrados na literatura, onde a suplementação de CAR não influenciou nos consumo alimentar e hídrico, bem como parâmetros de peso dos animais (35,36).

Devido as suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antiglicante, a CAR tem sido alvo de estudos para o tratamento de doenças e comorbidades, principalmente em roedores, uma vez que estes animais, diferentemente dos humanos, não possuem a enzima carnosinase 1 (CN1, ou carnosinase sérica), responsável pela decomposição da CAR no organismo, elevando assim os níveis de CAR com a suplementação da mesma (37,38). Para solucionar esta questão em humanos e aumentar as concentrações de CAR no organismo, estão sendo desenvolvidos derivados que sejam impermeáveis ao metabolismo da carnosinase, como o carnosinol, afim de melhorar sua biodisponibilidade e prolongar seu efeito (39). Em contrapartida, há estudos na literatura que relataram que a suplementação com CAR em humanos foi capaz de reduzir os níveis urinários de TGF- β (Fator de crescimento transformador β) em indivíduos com diabetes tipo 2, atuando como renoprotetor (40), e os níveis de resistina e leptina em indivíduos obesos e com sobrepeso, demonstrando que mesmo com a presença da enzima CN1, a suplementação em humanos possui ações benéficas (41).

A MAFLD é definida pela presença da esteatose hepática associada com obesidade ou diabetes do tipo 2, ou em indivíduos magros, com hipertensão arterial, circunferência abdominal, PCR alto, dislipidemia e RI, além disso, também está associada ao desenvolvimento da síndrome metabólica (3). Em nosso estudo, o grupo MAFLD apresentou obesidade (representada em nosso trabalho pelo índice de adiposidade), hipertensão arterial, dislipidemia e RI, evidenciando a presença da doença. A suplementação com CAR no grupo que recebeu a dieta hipercalórica, não influenciou nos níveis de índice de adiposidade, hipertensão e colesterol total encontrados no grupo MAFLD, porém foi capaz de atenuar os níveis de triglicerídeos plasmáticos, bem como melhorar as concentrações do colesterol HDL. Estudos relacionados a obesidade e síndrome metabólica não visualizaram efeitos da CAR sobre a pressão arterial sistólica e diastólica, assim como encontrado em nosso trabalho, provavelmente devido ao número de indivíduos participantes (42,43). Al-Sawalha *et al.* (2019) (44) realizaram um estudo em ratos com síndrome metabólica e suplementação com L-carnosina durante 16 semanas, onde também foram observadas alterações semelhantes com as encontradas em nosso trabalho sobre o perfil lipídico. Os efeitos positivos da CAR sobre os parâmetros lipídicos também foram observados em humanos portadores de diabetes tipo 2 (43), que receberam a suplementação de L-carnosina durante 12 semanas, demonstrando que a CAR pode atuar como um agente antidislipidêmico, podendo exercer efeitos protetores em modelos de complicações relacionadas a obesidade. O mecanismo pelo qual a CAR interfere no perfil lipídico não está bem elucidado, mas estudos sugerem que ela é capaz de induzir a atividade da lipase lipoproteica e atuar como sequestrador de radicais livres reduzindo os parâmetros lipídicos (45).

Os altos níveis de glicemia, insulina e HOMA, apresentados neste trabalho pelo grupo que recebeu a dieta hipercalórica (MAFLD), indicam um quadro de RI, fator importante para o desenvolvimento da MAFLD, uma vez que causa alterações na expressão de proteínas ligadas ao metabolismo de carboidratos nos hepatócitos, aumentando a síntese hepática de lipídios e consequentemente gerando o acúmulo destes no fígado. Em condições normais, os ácidos graxos livres são eliminados por β -oxidação, porém o excesso destes compostos gera uma disfunção mitocondrial, prejudicando o

processo de eliminação, então alguns são transportados para o sangue através de VLDL (46).

Em nosso trabalho a CAR não apresentou efeitos sobre a glicemia e RI, assim como encontrado em outros estudos. Giriş *et al.* (2014) (35), realizaram um modelo de RI em ratos induzido por uma dieta rica em frutose e observaram que a suplementação isolada de CAR não atuou significativamente na glicemia, insulina e HOMA dos animais em comparação aos que receberam apenas a dieta, porém obteve resultados satisfatórios com relação aos triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, assim como apresentado em nosso trabalho. Aldini *et al.* (2011) (47) constataram que a CAR (L-carnosina e D-carnosina) não influenciou nos valores de glicose, porém reduziu significativamente as concentrações de insulina e HOMA em ratos zucker obesos.

Em um quadro de obesidade, associada a hiperglicemia e RI, pode ocorrer uma exaustão das células β -pancreáticas, que são responsáveis por controlar os níveis de insulina no organismo, gerando uma intolerância à glicose, avaliada em ratos através do IPGTT, que pode ser realizado para observar a resposta direta à glicose, sem a influência de sua absorção no intestino (30,48). Em nosso trabalho observamos que os animais que receberam a dieta hipercalórica durante as 17 semanas de indução, desenvolveram intolerância à glicose, porém, após as 4 semanas de suplementação com CAR, foi visto através da AUC que o grupo MAFLD+CAR reduziu os níveis de glicemia quando comparado ao grupo MAFLD e as suas próprias concentrações antes da suplementação. Estudos em animais com obesidade induzida por dieta, obtiveram resultados semelhantes aos encontrados aqui, com maiores índices de IPGTT em grupos que receberam a dieta hipercalórica em comparação aos grupos controles (30,49). Através de nossos dados, podemos notar uma melhor captação de glicose pela CAR, diminuindo a glicemia na corrente sanguínea e consequentemente a glicose disponível para entrar no fígado, evitando que ocorra a lipogênese *de novo* e o acúmulo de lipídios no tecido hepático. Dados na literatura mostram uma correlação positiva entre a CAR e o aumento da massa de células β -pancreáticas, assim como o efeito positivo da CAR em estimular a produção de

insulina e consequentemente a captação de glicose pelo músculo esquelético (50,51).

O alto consumo de alimentos industrializados e com quantidade excessiva de carboidratos e gorduras, associado a falta de exercícios físicos, gera um balanço energético positivo, ocasionando em hipertrofia e hiperplasia de adipócitos. Essa alteração no tecido adiposo decorrente da obesidade, causa um acúmulo de ácidos graxos no tecido, bem como alterações na produção de citocinas inflamatórias (52,53). Quando os hepatócitos atingem sua capacidade de armazenar lipídios, a lipotoxicidade e o estresse hepatocelular levam a apoptose e então, as quimiocinas são liberadas para ativar os macrófagos residentes, as células de kupffer e os macrófagos derivados de monócitos, que são responsáveis por produzir citocinas inflamatórias (54). Os macrófagos são fatores importantes na progressão da MAFLD, a sua proliferação e diferenciação são controladas e dependentes de estímulos extracelulares, assim como de cascatas de sinalização celular. Outro componente importante na progressão da lesão hepática, é o fator inibidor de migração de macrófagos (MIF, do inglês *Macrophage migration inhibitory factor*), que é o responsável por mediar a inflamação de macrófagos e monócitos, regular diversas outras citocinas pró-inflamatórias, além de participar da regulação do metabolismo energético no fígado e no tecido adiposo, podendo contribuir para o desenvolvimento da obesidade, assim como de diabetes e o acúmulo de lipídios hepáticos (55,56).

Apesar de não ter sido vista uma diferença significativa entre o grupo MAFLD e o grupo Co para os macrófagos CD68, a CAR atenuou significativamente a ativação dos mesmos em comparação ao grupo MAFLD. Dados semelhantes foram encontrados na literatura, onde a CAR atenuou os infiltrados inflamatórios (monócitos e macrófagos) (57). Outro estudo relatou uma diminuição significativa de macrófagos CD68 em camundongos com lesões ateroscleróticas, tratados com CAR (58). A atuação da CAR nos macrófagos pode estar relacionada ao seu potencial de diminuir o estresse oxidativo, que está diretamente relacionado com a inflamação, porém, a CAR também pode estar atuando no MIF, gerando uma diminuição na atividade de macrófagos CD68 no modelo de obesidade. Aiello et al. (59) observaram que a CAR aumentou o MIF em um modelo de pele 3D, associando este efeito a

ação antioxidante da CAR e seu poder de reduzir o estresse oxidativo, assim como de efeito positivo no envelhecimento.

O estresse oxidativo também é uma alteração importante que favorece o desenvolvimento da MAFLD, uma vez que o acúmulo hepático de lipídios é responsável por um aumento na produção de EROs. O armazenamento hepático de triglicerídeos e colesterol é um mecanismo inicial para prevenir a toxicidade, porém, com a esteatose em excesso, a lipotoxicidade e glicotoxicidade podem ser induzidas no fígado, produzindo as EROs em diversas organelas (60,61). Diversos estudos têm demonstrado a vulnerabilidade do fígado ao estresse oxidativo, podendo exercer um papel importante no desenvolvimento e progressão de lesões hepáticas. AOPP é um marcador para estresse oxidativo, que possui a finalidade de estimar o grau de oxidação de proteínas. De maneira geral, AOPPs são transportados por proteínas plasmáticas oxidadas e são considerados antagonistas do receptor scavenger classe B tipo I de HDL, sendo eliminados principalmente no fígado e baço, por conta da alta expressão dos receptores nestes tecidos. Diante disso, o fígado tornou-se um órgão alvo para estudo da expressão dos produtos avançados de oxidação proteica, principalmente após alguns estudos demonstrarem um papel importante de AOPP em diversas doenças hepáticas. Estudos indicaram o acúmulo de AOPP em lesões no fígado, como na MAFLD e na insuficiência hepática (60,62). Maiores níveis de AOPP foram descritos em estudos realizados com humanos e animais, em indivíduos portadores da MAFLD, associada também a dislipidemia, inflamação e RI (63,64).

Em nosso trabalho, é possível notar níveis plasmáticos e hepáticos elevados de AOPP no grupo que recebeu a dieta hipercalórica (MAFLD) com relação ao grupo controle, indicando o estresse oxidativo causado pela dieta. Em contrapartida, o grupo MAFLD+CAR atenuou as concentrações plasmáticas e hepáticas de AOPP com relação ao grupo MAFLD. Também é possível notar menores concentrações hepáticas do grupo Co+CAR em comparação ao grupo Co, podendo estar relacionada a saúde e qualidade dos animais utilizados no estudo. Estes dados corroboram com os descritos na literatura, onde a CAR reduziu os níveis plasmáticos e hepáticos de AOPP em ratos com diabetes induzida por dieta hipercalórica e estreptozotocina, possivelmente devido aos seu efeito protetor contra o estresse oxidativo,

desintoxicando componentes reativos e produzindo compostos menos deletérios ao sistema oxidante, como é o caso das proteínas carnosiniladas, que inibem a conversão oxidativa de proteínas glicadas em AGEs (65,66). Yilmaz *et al.* (2017) (67) relataram que a CAR diminuiu os níveis plasmáticos e hepáticos de AOPP em ratos com estresse oxidativo induzido por metilglioxal, associando esta atividade ao seu potencial efeito antioxidante, como agente quelante de íons e de sequestrador de EROs, impedindo modificações em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causadas por íons metálicos para gerar radicais livres ou pelas próprias EROs. Estudos descreveram que o anel imidazólico presente na estrutura da CAR possui um papel importante na inibição da formação de espécies reativas, além do potencial antiglicante da CAR, impedindo a formação de proteínas anormais que podem gerar AGEs (20,68).

O modelo experimental e de dieta proposto neste estudo promoveu alterações hepáticas no grupo MAFLD, como a presença de esteatose observada nas análises histológicas, através da coloração de HE e Oil red, porém sem alterações de AST e ALT, apontando para uma possível não evolução da lesão. Em situações normais, os ácidos graxos são armazenados no tecido adiposo, porém quando há uma grande oferta destes compostos através da dieta, são armazenados em outros tecidos, como é o caso do fígado. O consumo de carboidratos em excesso, como a frutose por exemplo, também é responsável pelo aumento da concentração hepática de ácidos graxos livres, devido a lipogênese *de novo* (11,69). Os hepatócitos captam os ácidos graxos para posterior degradação, porém devido à sobrecarga da capacidade metabólica hepática, há um acúmulo destes na forma de triglicerídeos, gerando a esteatose hepática, como demonstrado em nosso trabalho, através de uma maior concentração de triglicerídeos e colesterol hepáticos no grupo MAFLD, juntamente com um maior score de esteatose. Nossos achados corroboram com os encontrados em outros trabalhos de nosso grupo, evidenciando a efetividade da dieta no desenvolvimento destas comorbidades (4,28).

Neste trabalho a CAR atuou positivamente no tecido hepático, reduzindo os níveis de esteatose, triglicerídeos e colesterol. Não há muitos estudos na literatura relacionando a CAR com o tratamento ou prevenção da MAFLD. Giriş

et al. (2014) (35) analisaram os efeitos da CAR isoladamente e com α -tocoferol em ratos com DHGNA induzida por uma dieta rica em frutose, onde observaram que a CAR isolada foi capaz de reduzir os níveis de triglicerídeos hepáticos, porém não atuou nos níveis de colesterol e esteatose hepática. Os autores apontaram para um possível efeito hepato-protetor da CAR, devido sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antilipogenica. Outro estudo realizado em ratos com DHGNA induzida por dieta rica em gorduras, demonstrou que a CAR melhorou os níveis hepáticos de triglicerídeos e colesterol, além de atenuar a atividade das enzimas lipogênicas málica, ácido graxo sintase e HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) redutase, que possuem um importante papel na biossíntese de triglicerídeos e colesterol nos tecidos adiposo e hepático (23).

Dentre as diversas funções essenciais do fígado para manter a homeostase do organismo, a participação no metabolismo lipídico é uma das mais importantes. A captação de lipídios pelo fígado pode ocorrer de duas principais formas: através do transporte dos ácidos graxos presentes no sangue pelas lipoproteínas e pelo processo de lipogênese *de novo*. Os lipídios são eliminados através da β -oxidação principalmente nas mitocôndrias e pelo transporte através da VLDL (70). O acúmulo de lipídios hepático é o resultado de um desequilíbrio entre as vias de aquisição dos lipídios e as vias de eliminação, podendo ser influenciado por diversos fatores, como a RI e o consumo excessivo de alimentos ricos em açúcar e gordura, contribuindo para a esteatose hepática e a MAFLD. A lipogênese *de novo* é regulada por diversos fatores, como a proteína de ligação ao elemento resposta à carboidratos (ChREBP, do inglês *carbohydrate reponse element-binding protein*) e a proteína de ligação ao elemento regulatório esterol 1c (SREPB1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein 1c*). A oxidação dos ácidos graxos é regulada principalmente pelo PPAR- α , reduzindo os níveis de ácidos graxos presentes no fígado, utilizando-os como fonte de energia. Porém, diante de uma disfunção mitocondrial, o processo de β -oxidação é prejudicado, gerando assim o acúmulo de gordura, bem como a produção de EROs (15,23,71).

Em nosso trabalho, o grupo MAFLD apresentou menor expressão gênica de PPAR- α em comparação ao grupo Co. O PPAR- α é expresso em tecidos

que necessitam de energia e, portanto, possuem altas taxas de β -oxidação, como o fígado, e sua ativação se dá principalmente em situações sob privação de energia, sendo o principal regulador do metabolismo lipídico (72). A suplementação com CAR no grupo indução a MAFLD (MAFLD+CAR), elevou os níveis de mRNA em comparação ao grupo MAFLD, apontando para uma possível atuação neste componente. Não há dados na literatura relatando a atuação da CAR sobre o PPAR- α , porém há estudos onde a β -alanina, precursora da CAR, foi capaz de estimular a expressão de PPAR- β/δ , regulador chave do equilíbrio lipídico muscular, sugerindo que os dipeptídeos histidil podem ser ligantes naturais de PPARs (73). Sun *et al.* (74) relataram que a expressão de PPAR- γ foi diminuída em ratos que receberam uma dieta rica em gordura, em contrapartida, os animais que receberam a suplementação com altas doses de histidina, outro precursor da CAR, obtiveram um aumento na expressão do PPAR- γ no tecido adiposo.

Os resultados em nosso trabalho sugerem uma possível atuação da CAR no metabolismo lipídico, diante da redução do IPGTT, triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, colesterol hepático, esteatose e estresse oxidativo, bem como aumento na expressão gênica de PPAR- α . O estudo realizado por Mong *et al.* (2011) (23) corrobora com estes achados, uma vez que foi observado que a CAR foi capaz de estimular a atividade de enzimas presentes no metabolismo lipídico, promovendo um efeito protetivo contra a esteatose e a obesidade através da regulação de certos fatores lipogênicos. Kim *et al.* (2011) (75) associaram o efeito da CAR e alanina em melhorar o perfil lipídicos de ratos que receberam dieta rica em gordura, a atividade da lipase lipoproteica ou através do metabolismo do colesterol no fígado. Alguns dados na literatura (76) apontam para o efeito da CAR no perfil lipídico estar relacionado a insulina, porém de acordo com os dados encontrados em nosso trabalho e os descritos por Al-Sawalha *et al.* (2019) (44), em que a CAR não teve influência sobre os níveis de insulina, novas investigações devem ser realizadas acerca do assunto, incluindo sua possível atuação na atividade da lipase lipoproteica.

De maneira geral, a CAR foi capaz de atenuar os níveis de intolerância à glicose, triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, colesterol hepático, bem como melhorar os níveis de colesterol HDL, esteatose hepática, macrófagos CD68, estresse oxidativo e PPAR- α . Portanto, podemos concluir que a CAR atua em

importantes processos fisiopatológicos da MAFLD, sendo um potencial composto terapêutico para o controle da doença.

Referências Bibliográficas

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
2. Eslam M, Sanyal AJ, George J, Sanyal A, Neuschwander-Tetri B, Tiribelli C, et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2020 May;158(7):1999-2014.e1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508520301712>
3. Zhou XD, Cai J, Targher G, Byrne CD, Shapiro MD, Sung KC, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and implications for cardiovascular risk and disease prevention. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2022;21(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01697-0>
4. Francisqueti-Ferron FV, Silva JP das C, Garcia JL, Ferron AJT, Kano HT, Silva CCV de A, et al. Preventive Effect of Gamma-Oryzanol on Physiopathological Process Related to Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Animals Submitted to High Sugar/Fat Diet. *Livers* [Internet]. 2022 Aug 10;2(3):146–57. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-4389/2/3/13>
5. Carneros D, López-Lluch G, Bustos M. Physiopathology of lifestyle interventions in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*. 2020;12(11):1–23.
6. Lim GEH, Tang A, Han Ng C, Chin YH, Lim WH, Tan DJH, et al. An Observational Data Meta-analysis on the Differences in Prevalence and Risk Factors Between MAFLD vs NAFLD. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2021;
7. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits”?

- Gastroenterology [Internet]. 1998 Apr;114(4):842–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508598705992>
8. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? Gastroenterology. 1998;114(4 I):842–5.
 9. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism [Internet]. 2016 Aug;65(8):1038–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049515003832>
 10. Vancells Lujan P, Viñas Esmel E, Sacanella Meseguer E. Overview of non-alcoholic fatty liver disease (Nafld) and the role of sugary food consumption and other dietary components in its development. Nutrients. 2021;13(5).
 11. Rives C, Fougerat A, Ellero-simatos S, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payraastre L, et al. Oxidative Stress in NAFLD : Role of Nutrients and Food Contaminants. Biomolecules. 2020;10(12).
 12. Jia Q, Xia Y, Zhang Q, Wu H, Du H, Liu L, et al. Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults. Eur J Clin Nutr. 2015;69.
 13. Oddy W, Herbison C, Jacoby P, Ambrosini G, O’Sullivan T, Ayonrinde O, et al. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. Am J Gastroenterol. 2013;108(5):778–85.
 14. Yki-Järvinen H, Luukkonen PK, Hodson L, Moore JB. Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2021 Nov 13;18(11):770–86. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-021-00472-y>
 15. Arroyave-ospina JC, Wu Z, Geng Y, Moshage H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease : Implications for Prevention and Therapy. Antioxidants. 2021;10(174):1–24.
 16. Salvoza N, Giraudi PJ, Tiribelli C, Rosso N. Natural Compounds for

- Counteracting Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Advantages and Limitations of the Suggested Candidates. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5).
17. Nassir F. NAFLD: Mechanisms, Treatments, and Biomarkers. *Biomolecules*. 2022;12(6).
 18. Aldini G, de Courten B, Regazzoni L, Gilardoni E, Ferrario G, Baron G, et al. Understanding the antioxidant and carbonyl sequestering activity of carnosine: direct and indirect mechanisms. *Free Radic Res* [Internet]. 2021;55(4):321–30. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1856830>
 19. MATTHEWS JJ, ARTIOLI GG, TURNER MD, SALE C. The Physiological Roles of Carnosine and β -Alanine in Exercising Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2019 Oct;51(10):2098–108. Available from: <https://journals.lww.com/10.1249/MSS.0000000000002033>
 20. Chmielewska K, Dzierzbicka K, Inkielewicz-Stępnia I, Przybyłowska M. Therapeutic Potential of Carnosine and Its Derivatives in the Treatment of Human Diseases. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2020 Jul 20;33(7):1561–78. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.0c00010>
 21. Albrecht T, Schilperoort M, Zhang S, Braun JD, Qiu J, Rodriguez A, et al. Carnosine Attenuates the Development of both Type 2 Diabetes and Diabetic Nephropathy in BTBR ob/ob Mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 10;7(1):44492. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep44492>
 22. Al-Sawalha NA, Alshogran OY, Awawdeh MS, Almomani BA. The effects of L-Carnosine on development of metabolic syndrome in rats. *Life Sci*. 2019;237(September).
 23. Mong MC, Chao CY, Yin MC. Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2011;653(1–3):82–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.001>
 24. Schwank-Xu C, Forsberg E, Bentinger M, Zhao A, Ansurudeen I, Dallner G, et al. L-Carnosine Stimulation of Coenzyme Q10 Biosynthesis

- Promotes Improved Mitochondrial Function and Decreases Hepatic Steatosis in Diabetic Conditions. *Antioxidants* [Internet]. 2021 May 17;10(5):793. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/793>
25. Francisqueti FV, Minatel I, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva V dos S, Garcia JL, 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(12).
 26. Fatih Aydın A, Küçükgergin C, Bingöl İ, Doğan-Ekici I, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effect of Carnosine on Renal Function, Oxidation and Glycation Products in the Kidneys of High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2017 May 13;125(05):282–9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-100117>
 27. Kalaz EB, Aydın AF, Doğan-Ekici I, Çoban J, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Protective effects of carnosine alone and together with alpha-tocopherol on lipopolysaccharide (LPS) plus ethanol-induced liver injury. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016;42:23–9.
 28. Costa MR, Garcia JL, Silva CCV de A, Ferron AJT, Francisqueti-Ferron FV, Hasimoto FK, et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Antioxidants*. 2019;8(8):1–17.
 29. Siqueira JS, Vieira TA, Nakandakare-Maia ET, Palacio TLN, Sarzi F, Garcia JL, et al. Bergamot leaf extract treats cardiorenal metabolic syndrome and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar fat diet. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2022 Oct;556:111721. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720722001691>
 30. Yoshitsugu R, Kikuchi K, Hori S, Iwaya H, Hagio M, Shimizu H, et al. Correlation between 12 α -hydroxylated bile acids and insulin secretion during glucose tolerance tests in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2020 Dec 15;19(1):9. Available from:

- <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-020-1193-2>
31. Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. Sookoian SC, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Dec 23;9(12):e115922. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0115922>
 32. Romualdo GR, Valente LC, Sprocatti AC, Bacil GP, de Souza IP, Rodrigues J, et al. Western diet-induced mouse model of non-alcoholic fatty liver disease associated with metabolic outcomes: Features of gut microbiome–liver–adipose tissue axis. Nutrition [Internet]. 2022 Nov;103–104:111836. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900722002490>
 33. Ferron AJT, Aldini G, Francisqueti-Ferron FV, Silva CCV de A, Bazan SGZ, Garcia JL, et al. Protective Effect of Tomato-Oleoresin Supplementation on Oxidative Injury Recovers Cardiac Function by Improving β -Adrenergic Response in a Diet-Obesity Induced Model. Antioxidants [Internet]. 2019 Sep 2;8(9):368. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/9/368>
 34. Garcia JL, Vileigas DF, Gregolin CS, Costa MR, Francisqueti-Ferron FV, Ferron AJT, et al. Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. Eur J Nutr [Internet]. 2022 Mar 12;61(2):901–13. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00394-021-02691-0>
 35. Giriş M, Doğru-Abbasoğlu S, Kumral A, Olgaç V, Koçak-Toker N, Uysal M. Effect of carnosine alone or combined with α -tocopherol on hepatic steatosis and oxidative stress in fructose-induced insulin-resistant rats. J Physiol Biochem. 2014;70(2):385–95.
 36. Everaert I, Van der Stede T, Stautemas J, Hanssens M, van Aanhold C, Baelde H, et al. Oral anserine supplementation does not attenuate type-2 diabetes or diabetic nephropathy in BTBR ob/ob mice. Amino Acids

- [Internet]. 2021;53(8):1269–77. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03033-4>
37. Caruso G. Unveiling the Hidden Therapeutic Potential of Carnosine, a Molecule with a Multimodal Mechanism of Action: A Position Paper. *Molecules* [Internet]. 2022 May 20;27(10):3303. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/10/3303>
 38. Dođru-Abbasođlu S, Koçak-Toker N, Uysal M. Carnosine as a Putative Antioxidant in Usage Against Liver Disease. In: *The Liver: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. 2018. p. 295–304.
 39. Anderson EJ, Vistoli G, Katunga LA, Funai K, Regazzoni L, Blake Monroe T, et al. A carnosine analog mitigates metabolic disorders of obesity by reducing carbonyl stress. *J Clin Invest*. 2018;128(12):5280–93.
 40. Siriwattanasit N, Satirapoj B, Supasynhd O. Effect of Oral carnosine supplementation on urinary TGF- β in diabetic nephropathy: a randomized controlled trial. *BMC Nephrol*. 2021;22(1):1–7.
 41. Baye E, Ukropec J, de Courten MPJ, Mousa A, Kurdiova T, Johnson J, et al. Carnosine supplementation improves serum resistin concentrations in overweight or obese otherwise healthy adults: A pilot randomized trial. *Nutrients*. 2018;10(9).
 42. de Courten B, Jakubova M, de Courten MP, Kukurova IJ, Vallova S, Krumpolec P, et al. Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial. *Obesity* [Internet]. 2016 May;24(5):1027–34. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oby.21434>
 43. Houjeghani S, Kheirouri S, Faraji E, Jafarabadi MA. L-Carnosine supplementation attenuated fasting glucose, triglycerides, advanced glycation end products, and tumor necrosis factor- α levels in patients with type 2 diabetes: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Nutr Res* [Internet]. 2018;49:96–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.11.003>
 44. Al-Sawalha NA, Alshogran OY, Awawdeh MS, Almomani BA. The effects of L-Carnosine on development of metabolic syndrome in rats. *Life Sci*

- [Internet]. 2019;237:116905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116905>
45. Peng W, Mao P, Liu L, Chen K, Zhong Y, Xia W, et al. Effect of carnosine supplementation on lipid profile, fasting blood glucose, HbA1C and insulin resistance: A systematic review and meta-analysis of long-term randomized controlled trials. *Complement Ther Med* [Internet]. 2020;48(August 2019):102241. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102241>
 46. Marušić M, Paić M, Knobloch M, Liberati Pršo AM. NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2021;2021.
 47. Aldini G, Orioli M, Rossoni G, Savi F, Braidotti P, Vistoli G, et al. The carbonyl scavenger carnosine ameliorates dyslipidaemia and renal function in Zucker obese rats. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1339–54.
 48. Ma Y, Liu X, Wu Y, Wang W, Chang X. Mechanism of protection from insulin resistance by toll-like receptor 2 deficiency in high-fat diet fed mice: involvement in macrophage polarization. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2022 Apr 16;49(4):2591–9. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11033-021-07061-x>
 49. He M, Wang J, Wang Y, Sui J, Zhang M, Ding X, et al. High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice. *Chronic Dis Transl Med* [Internet]. 2020 Sep;6(3):198–207. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.cdtm.2020.06.003>
 50. Cripps MJ, Hanna K, Lavilla C, Sayers SR, Caton PW, Sims C, et al. Carnosine scavenging of glucolipotoxic free radicals enhances insulin secretion and glucose uptake. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 17;7(1):13313. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13649-w>
 51. Peters V, Yard B, Schmitt CP. Carnosine and Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem* [Internet]. 2020 Apr 23;27(11):1801–12. Available from:

<https://www.eurekaselect.com/170967/article>

52. Garcia JL, Francisqueti FV, Ferraz AP da CR, Ferron AJT, Costa MR, Gregolin CS, et al. High Sugar-Fat Diet Induces Metabolic-Inflammatory Disorders Independent of Obesity Development. *Food Nutr Sci*. 2019;10:664–77.
53. White U, Ravussin E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. *Diabetologia*. 2019;62(1):17–23.
54. Li H, Zhou Y, Wang H, Zhang M, Qiu P, Zhang M, et al. Crosstalk Between Liver Macrophages and Surrounding Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jun 24;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01169/full>
55. Thibaut R, Gage MC, Pineda-Torra I, Chabrier G, Venteclef N, Alzaid F. Liver macrophages and inflammation in physiology and physiopathology of non-alcoholic fatty liver disease. *FEBS J* [Internet]. 2022 Jun 2;289(11):3024–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.15877>
56. Gligorovska L, Teofilović A, Vojnović Milutinović D, Miladinović N, Kovačević S, Veličković N, et al. Macrophage migration inhibitory factor deficiency aggravates effects of fructose-enriched diet on lipid metabolism in the mouse liver. *BioFactors* [Internet]. 2021 May 31;47(3):363–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biof.1711>
57. Chen P-J, Tseng J-K, Lin Y-L, Wu Y-HS, Hsiao Y-T, Chen J-W, et al. Protective Effects of Functional Chicken Liver Hydrolysates against Liver Fibrogenesis: Antioxidation, Anti-inflammation, and Antifibrosis. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2017 Jun 21;65(24):4961–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.7b01403>
58. Barski OA, Xie Z, Baba SP, Sithu SD, Agarwal A, Cai J, et al. Dietary Carnosine Prevents Early Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein E–Null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2013 Jun;33(6):1162–70. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.112.300572>

59. Aiello G, Rescigno F, Meloni M, Baron G, Aldini G, Carini M, et al. Oxidative Stress Modulation by Carnosine in Scaffold Free Human Dermis Spheroids Model: A Proteomic Study. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Jan 27;23(3):1468. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/3/1468>
60. Sabir U, Irfan HM, Alamgeer, Ullah A, Althobaiti YS, Asim MH. Reduction of Hepatic Steatosis, Oxidative Stress, Inflammation, Ballooning and Insulin Resistance After Therapy with Safranal in NAFLD Animal Model: A New Approach. *J Inflamm Res*. 2022;15:1293–316.
61. Yang DK, Jo DG. Mulberry Fruit Extract Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) through Inhibition of Mitochondrial Oxidative Stress in Rats. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2018;2018.
62. Zhao Y, Zhang L, Ouyang X, Jiang Z, Xie Z, Fan L, et al. Advanced oxidation protein products play critical roles in liver diseases. *Eur J Clin Invest*. 2019;49(6):1–9.
63. Klisic A, Kavaric N, Ninic A, Kotur-Stevuljevic J. Oxidative stress and cardiometabolic biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97686-6>
64. Sabir U, Irfan HM, Alamgeer, Ullah A, Althobaiti YS, Asim MH. Reduction of Hepatic Steatosis, Oxidative Stress, Inflammation, Ballooning and Insulin Resistance After Therapy with Safranal in NAFLD Animal Model: A New Approach. *J Inflamm Res*. 2022;15(February):1293–316.
65. Aydın AF, Bingül İ, Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Doğru Abbasoğlu S, Uysal M. Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol*. 2017;98(5):278–88.
66. Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(13):1431–45.
67. Yılmaz Z, Kalaz EB, Aydın AF, Soluk-Tekkeşin M, Doğru-Abbasoğlu S,

- Uysal M, et al. The effect of carnosine on methylglyoxal-induced oxidative stress in rats. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2017;123(3):192–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/13813455.2017.1296468>
68. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1803–45.
 69. Conde de la Rosa L, Goicoechea L, Torres S, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Role of Oxidative Stress in Liver Disorders. *Livers* [Internet]. 2022 Oct 14;2(4):283–314. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-4389/2/4/23>
 70. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;75(18):3313–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
 71. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2020;152:116–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
 72. Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, Tanaka N. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Mar 17;21(6):2061. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2061>
 73. Schnuck JK, Sunderland KL, Kuennen MR, Vaughan RA. Characterization of the metabolic effect of β -alanine on markers of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Exerc Nutr Biochem* [Internet]. 2016 Jun;20(2):34–41. Available from: <http://e-pan.org/journal/view.php?doi=10.20463/jenb.2016.06.20.2.5>
 74. Sun X, Feng R, Li Y, Lin S, Zhang W, Li Y, et al. Histidine supplementation alleviates inflammation in the adipose tissue of high-fat diet-induced obese rats via the NF- κ B- and PPAR γ -involved pathways. *Br J Nutr* [Internet]. 2014 Aug 28;112(4):477–85. Available from: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114514001056/ty>

pe/journal_article

75. Kim MY, Kim EJ, Kim YN, Choi C, Lee BH. Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutr Res Pract*. 2011;5(5):421–8.

76. Ichikawa T, Liang J, Kitajima S, Koike T, Wang X, Sun H, et al. Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed Tg rabbits. *Atherosclerosis* [Internet]. 2005 Mar;179(1):87–95. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002191500400574X>

Conclusão

Em resumo, este estudo demonstrou que a dieta rica em açúcar e gordura induziu a obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina, intolerância a glicose, estresse oxidativo, esteatose hepática, bem como apresentou alterações nos níveis de triglicerídeos e colesterol hepáticos, e na expressão de PPAR- α . Em contrapartida, a CAR foi capaz de atenuar os níveis de IPGTT, triglicerídeos plasmáticos e hepáticos, colesterol hepático, como também melhorar os níveis de colesterol HDL, esteatose hepática, macrófagos CD68, estresse oxidativo e expressão de PPAR- α . Dessa forma, podemos concluir que a CAR demonstrou ser uma alternativa terapêutica para as doenças relacionadas a obesidade, como a MAFLD.

Anexos

ANEXO 1

 		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 1322/2019 – CEUA		
Certificamos que o projeto intitulado: "Efeitos da carnosina sobre a fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos" , conduzido pela Pesquisadora: Mariane Róvero Costa – Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto – Colaboradores: Carol Cristina Vagula de Almeida Silva, Jéssica Leite Garcia e Prof. Giancarlo Aldini, registrada com o nº 1322/2019 , que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – 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 ordinária de 30 de outubro de 2019.		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	01 de janeiro de 2022	
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar	
Nº de animais	40 animais	
Idade/Peso	200 gramas - 02meses	
Sexo	Masculino	
Origem	Biotério Central	


 Sara Rosa Stanley Sampaio
 Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP


 Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP, CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de



Botucatu, 12 de janeiro de 2023.

Ao

Conselho do Programa de Pós-graduação em Patologia

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Prezados Senhores,

Declaramos que a (X) dissertação de mestrado / () tese de doutorado intitulada "Efeitos da suplementação de carnosina sobre a doença hepática gordurosa associada às alterações metabólicas induzidas por dieta em ratos" de autoria do(a) discente Núbia Alves Grandini é subprojeto do projeto intitulado "Efeitos da carnosina sobre a fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta hipercalórica rica em carboidratos" que foi submetido e aprovado pelo () CEP / (X) CEUA, conforme parecer anexo.

Declaramos que no subprojeto não houve alterações de procedimentos operacionais ou metodológicos daqueles constantes no projeto original e que o(a) discente integra a equipe do projeto.

Atenciosamente,

Mariane Róvero Costa
Pesquisador responsável identificado no parecer consubstanciado

Fernando Moreto
Orientador

Núbia Alves Grandini
Discente