

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO**

**DIETA CETOGÊNICA INDUZ ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS E HEPÁTICAS EM ANIMAIS OBESOS**

**SUENA CRISTINA RODRIGUES DE CARVALHO**

**São Luís - MA**

**2022**

**SUENA CRISTINA RODRIGUES DE CARVALHO**

**DIETA CETOGÊNICA INDUZ ALTERAÇÕES  
METABÓLICAS E HEPÁTICAS EM ANIMAIS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Paula Gameiro Cappelli

**Co-orientador:** Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto

**São Luís - MA**

**2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Carvalho, Suena Cristina Rodrigues de.

DIETA CETOGÊNICA INDUZ ALTERAÇÕES METABÓLICAS E  
HEPÁTICAS EM ANIMAIS OBESOS / Suena Cristina Rodrigues de  
Carvalho. - 2022.

61 f.

Coorientador(a): Bruno Araújo Serra Pinto.

Orientador(a): Ana Paula Gameiro Cappelli.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2022.

1. Dieta cetogênica. 2. Dieta de cafeteria. 3.  
Doença hepática gordurosa não alcoólica. 4. Obesidade. I.  
Cappelli, Ana Paula Gameiro. II. Pinto, Bruno Araújo  
Serra. III. Título.

**SUENA CRISTINA RODRIGUES DE CARVALHO**  
**DIETA CETOGENICA INDUZ ALTERAÇÕES METABÓLICAS E**  
**HEPÁTICAS EM ANIMAIS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Aprovada em        /        /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Paula Gameiro Cappelli (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto (Co-Orientador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio  
Universidade Estadual de Campinas

---

Profa. Dra. Karla Frida Torres Flister  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Nelo Eidy Zanchi  
Universidade Federal do Maranhão

*“Sempre antes de realizar um sonho, a Alma do Mundo resolve testar tudo aquilo que foi aprendido na caminhada. Ela faz isto não porque seja má, mas para que possamos, junto com o nosso sonho, conquistar também as lições que aprendemos seguindo em direção a ele. É o momento em que a maior parte das pessoas desiste. É o que chamamos, em linguagem do deserto, de “morrer de sede quando as tamareiras já apareceram no horizonte”. Confie em seu coração, mas não se esqueça de que você está no deserto. Ninguém deixa de sofrer as consequências de cada coisa que se passa debaixo do sol. Uma busca começa sempre com a Sorte de Principiante. E termina sempre com a Prova do Conquistador”.*

*Paulo Coelho*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meus mais sinceros agradecimentos a **Deus**, que me guiou nesta jornada, que deu-me forças para continuar, carregou-me em seu colo fazendo-me prosseguir e atingir um projeto arquitetado por Ele;

Agradeço aos meus pais, **Maria e Edmilson**, por sempre acreditarem em mim, pelo abraço inesperado quando meu esgotamento não era aparente, pelas palavras que se fizeram nas horas mais apropriadas, pelas infinitas vezes que abdicaram de projetos pessoais para que fosse possível o desenrolar desta jornada, por serem minha base, aqueles que sonham meus sonhos, que me fizeram enxergar o estudo como a minha fonte de mudanças e acreditar na máxima de que através dele alcançaria a transformação da minha vida e de tantas outras. Eu nada seria sem vocês;

Agradeço, em especial, a minha querida e amada orientadora **Ana Paula**, que me concedeu a chance de realizar este sonho. Quanta admiração sinto por você! Esteve ao meu lado em cada etapa, desde a escrita até os experimentos, segurando minha mão nos momentos que sozinha eu sei que jamais conseguiria, acreditou em mim quando eu não acreditava, deu-me ânimo para continuar quando eu fraquejava. Meu orgulho e apreço por você são inenarráveis. Agradeço imensamente pela brilhante orientação e pelo comprometimento que tens com a educação e desenvolvimento da ciência. Hoje posso dizer que além de uma orientadora eu tenho uma amiga;

Ao meu co-orientador **Bruno Araújo**, "**Bruninho**", serei eternamente grata por tudo que fizestes por mim, agradeço por tudo que, com muita dedicação pôde me ensinar, pelas palavras de incentivo, por ter me orientado em cada passo, o que foi imprescindível para fazer-me seguir e chegar até aqui. Agradeço por enxergar em mim um potencial que desacreditava existir. Serei eternamente agradecida não só pela dedicação para comigo, mas também pelos incansáveis esforços com a educação e com o futuro da ciência. Acredito ser impossível mensurar a quão grata sou. Minha gratidão é eterna, obrigada!;

Minha gratidão para aquelas que incansavelmente deram seu apoio, minhas irmãs **Ednilde, Iara, Sonara** e minha sobrinha **Alícia**, que além de sempre proferirem palavras de incentivo, dedicaram a mim seu afeto, se tornaram exímias ouvintes, que lutaram e fizeram o que estava ao alcance para que tudo se tornasse possível;

Aos meus colegas de IC's **Ana Victória, Mirza, Juliana e Thiago por se dedicarem tanto ao nosso projeto**. Em especial **Juliana e Thiago** que se fizeram presente até a conclusão deste projeto, com a leveza que possuem, conseguiram amenizar toda a rotina exaustiva, partilhamos de muito durante esse período, por inúmeros dias ficaram ao meu lado até altas horas para que não ficasse sozinha, tivemos muitos dias felizes regados a risadas, até mesmo quando as coisas fugiam do planejado. Vocês foram meu braço direito na conclusão deste ciclo. Obrigada por fazerem esta caminhada mais feliz. Sou grata em especial a **Ivana Letícia** (minha eterna duplinha) obrigada por diminuir todas as angústias e estresse e multiplicar a felicidade;

Agradeço ao **Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio)** que desde o primeiro instante me acolheu como uma família, onde pude aprender com cada um que cruzou meu caminho, ao **Lucas França** e ao Prof. **Antônio Marcus** pelo incentivo e ensinamentos dados com muita paciência e carinho. E aos demais membros do **LeFisio** que me guiaram nesta jornada científica, por terem deixado tudo mais leve até nos dias de experimentos que eu me via desesperada e vocês estavam lá comigo e por mim. Obrigada **Caio, Nathalee, Karla, Samira, Jonas Thamys, Breno, Ludmila, Amanda, Victor, Thamyres, Thaiane, Jonas, Marcus, Perla, Savana, João Pedro, Vinicyus, Gilberto, Jaqueline e Jessica**, que de forma direta ou indireta fizeram este trabalho ser concluído;

Ao meu melhor amigo **Verdson Frazão** por todo apoio durante minha trajetória acadêmica e pessoal, por acreditar que eu seria capaz e sempre me mostrar o lado bom da vida. Aos demais amigos que sempre estiveram comigo e entenderam minha ausência várias vezes e me apoiaram sempre, **Mauricio, Jéssica, Patrícia, Karolina, Arnaldo, André, Maria Vitória, Liliane, Manuela**

e **Lucas** (que mesmo longe se fazem presentes diariamente), **Priscylla, Laís, Luana, Gabi, Wallyson**. E a todos que por falta de espaço não pude citar;

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa no Maranhão – **FAPEMA** pelos recursos concedidos;

Agradeço, finalmente, à banca avaliadora por terem aceito o convite de analisar e avaliar este trabalho.



## RESUMO

**Introdução:** A obesidade é uma disfunção metabólica com aumento de prevalência em nível global, se tornando um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Nesse contexto, intervenções nutricionais visando o controle desta doença assumem uma importante relevância. A dieta cetogênica (DC) é uma dieta composta por altos níveis de gordura e baixos níveis de carboidratos e é referida como eficiente para rápida perda de peso. Apesar de sua ampla utilização, os efeitos desta dieta sobre o metabolismo e o funcionamento hepático ainda são controversos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos subcrônicos da dieta cetogênica (DC) sobre o metabolismo geral e funcionamento hepático de camundongos com obesidade e outras disfunções metabólicas. **Metodologia:** Camundongos machos Swiss pós desmame, foram divididos em dois grupos: grupo obeso que recebeu dieta de cafeteria (CAF) e grupo controle (CTR) que recebeu dieta padrão. Após 12 semanas de acompanhamento, os animais foram divididos em 5 grupos: grupo CTR/CTR, que continuou recebendo ração CTR; grupo CTR/DC, que substituiu a ração CTR por DC; grupo CAF/CAF, que continuou com dieta de cafeteria; grupo CAF/CTR, que substituiu a ração CAF por CTR; e grupo CAF/DC, que substituiu a ração CAF por DC. Os grupos foram acompanhados por mais 8 semanas. Durante todo período experimental foram realizadas aferições de peso corporal, ingestão alimentar, níveis glicêmicos e lipídicos, avaliação de transaminases, grau de tolerância à glicose e resistência à insulina. Após eutanásia, foi coletado sangue para dosagens bioquímicas finais e de insulina e fígado para avaliação de estresse oxidativo e perfil histopatológico. **Resultados:** A dieta CAF (grupo CAF/CAF) foi eficiente em induzir perfil obesogênico marcado por obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia, intolerância à glicose, resistência à insulina, injúrias hepáticas, estresse oxidativo e esteatose hepática. E a administração de DC para animais previamente obesos (grupo CAF/DC) não foi capaz de alterar este perfil disfuncional, sendo capaz de controlar somente os níveis glicêmicos. Da mesma forma, a administração de dieta DC para animais controle (grupo CTR/DC) também levou a instauração de desordens metabólicas e hepáticas, como os grupos acima citados. Por outro lado, a substituição da dieta CAF por CTR (grupo CAF/CTR) foi eficiente em reverter todos estes parâmetros. **Conclusão:** Nosso conjunto de dados sugere que a intervenção com DC não leva a perda de peso, instaura disfunções metabólicas em sadios e agrava em obesos e leva ao desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica. A substituição de uma dieta hipercalórica por uma normocalórica se mostra mais eficaz para o controle de disfunções metabólicas.

**Palavras-chave:** Dieta cetogênica; Obesidade; Doença hepática gordurosa não alcoólica; Dieta de cafeteria.

## ABSTRACT

**Background:** Obesity is a metabolic disorder with increasing prevalence at a global level, becoming one of the biggest public health problems today. In this context, nutritional interventions aimed at controlling this disease assume an important relevance. The ketogenic diet (KD) is a diet composed of high levels of fat and low carbohydrates and referred to as efficient for rapid weight loss. Despite its wide use, the effects of this diet on metabolism and liver function are still controversial. **Objective:** To evaluate the subchronic effects of the ketogenic diet (KD) on the general metabolism and liver function of mice with obesity and other metabolic disorders. **Methods:** Swiss male mice after weaning were divided into two groups: obese group that received cafeteria diet (CAF) and control group (CTR) that received standard diet. After 12 weeks of follow-up, the animals were divided into 5 groups: CTR/CTR group, which continued receiving CTR chow; CTR/DC group, which replaced the CTR diet with DC; CAF/CAF group, which continued with the diet cafeteria; CAF/CTR group, which replaced the CAF diet with CTR; and CAF/DC group, which replaced the CAF ration with DC. The groups were followed for an additional 8 weeks. During the entire experimental period, measurements of body weight, food intake, glycemic and lipid levels, evaluation of transaminases, degree of glucose tolerance and insulin resistance were performed. After euthanasia, blood was collected for final biochemical and insulin and liver measurements to evaluate oxidative stress and histopathological profile. **Results:** The CAF diet (CAF/CAF group) was efficient in inducing an obesogenic profile marked by central obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, glucose intolerance, insulin resistance, liver damage, oxidative stress and hepatic steatosis. And the administration of DC to previously obese animals (CAF/DC group) was not able to change this dysfunctional profile, being able to control only glycemic levels. Likewise, the administration of DC diet to control animals (CTR/DC group) also led to the establishment of metabolic and hepatic disorders, such as the mentioned groups above. On the other hand, replacing the CAF diet with CTR (CAF/CTR group) was efficient in reversing all these parameters. **Conclusion:** Our dataset suggests that CD intervention does not lead to weight loss, it establishes metabolic dysfunctions in healthy individuals and worsens it in obese individuals and leads to the development of non-alcoholic fatty liver disease. Replacing a hypercaloric diet with a normocaloric one is more effective in controlling metabolic disorders.

**Keywords:** Ketogenic diet; Obesity; Nonalcoholic fatty disease; Cafeteria diet.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAF	Cafeteria
CC	Corpos cetônicos
CEUA	Comitê de ética na utilização de animais
CHO	Carboidrato
CKK	Colicistoquinina
CTR	Controle
DC	Dieta cetogênica
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
FAL	Fosfatase alcalina
GTT	Teste de tolerância à glicose
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
IL-6	Interleucina fator 6
IMC	Índice de massa corporal
ITT	Testes de tolerância à insulina
LHS	Lipase hormônio sensível
MDA	Malondialdeído
RI	Resistência à insulina
SM	Síndrome metabólica
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
$\gamma$ GT	Gama glutamil transpeptidase

## FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Progressão da DHGNA e principais achados histológicos	20
<b>FIGURA 2</b>	Produção de corpos cetônicos	23
<b>FIGURA 3</b>	Esquema do desenho experimental	30
<b>FIGURA 4</b>	Avaliação morfométrica	35
<b>FIGURA 5</b>	Avaliação do perfil glicolipídico e resistência à insulina	39
<b>FIGURA 6</b>	Avaliação de danos hepáticos	42
<b>FIGURA 7</b>	Histopatologia hepática	45

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Principais achados após o consumo da dieta cetogênica	24
<b>TABELA 2</b>	Composição centesimal das dietas padrão, cetogênica e cafeteria	28
<b>TABELA 3</b>	Composição nutricional dos itens alimentares adicionados à dieta de cafeteria, conforme indicado pelos fabricantes do produto	30

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1	Síndrome metabólica e obesidade .....	16
2.2	Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) .....	17
2.3	Intervenções dietéticas para o controle de doenças metabólicas ....	20
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
4.1	Objetivo Geral.....	27
4.2	Objetivos específicos.....	27
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>28</b>
5.1	Dietas .....	28
5.2	Animais e desenho experimental .....	29
5.3	Avaliações bioquímicas .....	31
5.4	Teste oral de tolerância à glicose (GTT) .....	32
5.5	Testes de tolerância à insulina (ITT) .....	32
5.6	Análise histopatológica do fígado .....	32
5.7	Avaliação de estresse oxidativo .....	32
5.8	Análise dos Resultados .....	33
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não-transmissível (DCNT) caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal resultante de um balanço energético positivo, onde o consumo calórico supera o gasto (LEITNER et al., 2017). É uma doença de etiologia multifatorial, com destaque para fatores genéticos, socioeconômicos, comportamentais e ambientais, tais como estilo de vida sedentário e alto consumo de dietas hipercalóricas (JASTREBOFF et al., 2019).

Apontada como o mal do século XXI, é um problema de saúde pública global que se expande em proporções pandêmicas, acometendo de forma alarmante indivíduos independentemente de gênero, etnia, faixa etária e nível socioeconômico (APOVIAN, 2016). Levantamentos de 2015 estimam que aproximadamente 2 bilhões de adultos no mundo (39% da população) estejam com sobrepeso ou obesidade (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). No Brasil, a obesidade e o sobrepeso afetam aproximadamente 20,3% e 55,4% da população, respectivamente (BRASIL, 2021).

O excesso de gordura corporal está atrelado principalmente ao desenvolvimento de múltiplas desordens metabólicas, tais como dislipidemias aterogênicas, hiperglicemia, resistência à insulina (RI), doença hepática gordurosa não- alcoólica (DHGNA) e hipertensão (FRUH, 2017; SAXTON et al., 2019). A obesidade é ainda uma disfunção importante que compõe a síndrome metabólica (SM), um conjunto de desordens metabólicas que podem aumentar em duas e cinco vezes o risco de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (ENGIN, 2017).

Em decorrência de sua alta prevalência e por constituir um importante fator de morbimortalidade, a obesidade adquire uma grande relevância não apenas no cenário de saúde pública, mas também no contexto econômico e social, visto que gera uma aceleração do envelhecimento, perda de produtividade e um elevado ônus com a doença específica e doenças associadas (COLDITZ, 1992).

Diante desses dados preocupantes, o estudo e a implantação de medidas de intervenção dietéticas associadas a mudanças comportamentais são

as formas mais eficazes para garantir a redução desta prevalência e homeostase do balanço energético (TIMLIN et al., 2020).

A alimentação é de fato uma das principais formas de prevenir e reduzir patologias como a obesidade e o DM2. Atualmente, existem diversos tipos de dietas que levam a perda ponderal, dentre elas: a dieta do mediterrâneo, jejum intermitente, dietas com restrições de carboidratos como as dietas *low carb* e as dietas cetogênicas (CASTRO-BARQUERO et al., 2020). Apesar de algumas destas intervenções e estratégias dietéticas serem amplamente conduzidas, não é sabido quais destas intervenções são realmente eficazes e seguras para o paciente.

São sólidas as evidências que suportam que o aumento na ingestão de carboidratos (CHO), especialmente os de alto índice glicêmico, induzem RI, que configura um importante fator de gênese para a maioria das desordens metabólicas, tais como a obesidade e o DM2. De fato, o Estudo de Risco de Aterosclerose em Comunidades, um estudo de coorte birracial e prospectivo com mais de 3 mil participantes de 45 a 64 anos, demonstrou que maior ingestão de CHO aumenta em até 50% o risco de morte (SEIDELMANN et al., 2018). Neste sentido, a redução da ingestão de carboidratos assume um importante papel para a redução do peso corporal, melhoria do perfil glicêmico, lipídico e dos níveis pressóricos e de outras doenças endócrinas, como a DHGNA (BOLLA et al., 2019; WALTON et al., 2019; WATANABE et al., 2020).

As dietas cetogênicas (DC) são intervenções nutricionais baseadas em um maior consumo de gorduras e baixo teor de carboidratos, que desencadeia uma mudança sistêmica do metabolismo da glicose para o de ácidos graxos e mimetiza no corpo um estado de cetose semelhante ao jejum prolongado (MASOOD; ANNAMARAJU; UPPALURI, 2021).

Inicialmente, a DC foi utilizada como terapia à epilepsia não responsiva a medicamentos, porém foi observado que a mesma levava a perda de peso e melhora de alguns parâmetros metabólicos. A partir disto, essa dieta vem galgando posições de destaque na prática clínica ao demonstrar efeitos benéficos sobre a perda de peso, tratamento da obesidade, DM2, dislipidemias e até doenças neurodegenerativas (TAYLOR et al., 2018; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; PAOLI et al., 2019; LUUKKONEN et al., 2020). Todavia, ainda não existe um consenso na comunidade científica sobre os efeitos da DC, pois

enquanto uma série de estudos, como os acima citados, demonstram efeitos positivos, outros a descrevem como desencadeadora de dislipidemias, alterações hepáticas e RI (GRANDL et al., 2018).

A DC é uma dieta amplamente utilizada para conter ou sanar danos associados à obesidade, porém ainda não estão bem consolidados todos os riscos e benefícios relacionados a esta intervenção. Deste modo, nosso trabalho buscou avaliar se a dieta cetogênica atua como intervenção nutricional eficaz contra distúrbios metabólicos e danos hepáticos induzidos por uma dieta obesogênica de cafeteria, que mimetiza o consumo humano de *fast-foods*. Em paralelo, buscamos avaliar também se a simples substituição da dieta de cafeteria por uma dieta controle poderia acarretar resultados equivalentes ou melhores que a dieta cetogênica. Esperamos com nossos resultados evidenciar os benefícios e/ou malefícios relacionados ao uso de dieta cetogênica.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Síndrome metabólica e obesidade

A síndrome metabólica é definida como um conjunto de três ou mais disfunções metabólicas que aumentam o risco de morte por doenças cardiovasculares e diabetes mellitus 2 (DM2) (ALBERTI et al., 2009). Dentre os fatores de risco que compõem a SM, destacam-se a obesidade abdominal, hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia, dislipidemia aterogênica, resistência à insulina, hipertensão, doenças trombóticas e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (RANA et al., 2022). A obesidade e a resistência à insulina são os principais determinantes da SM e o crescimento de forma exponencial de ambas morbidades têm contribuído para elevar a SM ao patamar de uma pandemia (OLADEJO, 2011).

As causas da SM ainda constituem um desafio para os pesquisadores. No entanto, condições como predisposição genética, sedentarismo, tabagismo, um padrão nutricional desbalanceado, envelhecimento, estado pró-inflamatório e alterações hormonais podem ter um efeito causal (SHERLING; PERUMAREDDI; HENNEKENS, 2017). A SM vem expandindo em proporções epidêmicas com altos custos socioeconômicos, atingindo cerca de 25% da população adulta mundial e aumenta em 2,5 vezes complicações cardiovasculares e 5 vezes por DM2 (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2005). A SM vem ganhando maior destaque nos tempos atuais por conta do aumento exponencial da obesidade em todo o mundo.

A obesidade é uma doença metabólica, caracterizada pelo excesso de gordura corporal, resultante do balanço energético positivo, onde o consumo calórico supera o gasto, viabilizando o aumento dos estoques de gordura corporal. Assim como a SM, a etiologia da obesidade também tem origem multifatorial, resultante da interação de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais (STRINGHINI; SILVA; OLIVEIRA, 2007). Estima-se que aproximadamente 2 bilhões de adultos no mundo (39% da população) estejam com sobrepeso ou obesidade (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). No Brasil, a obesidade e o sobrepeso afetam aproximadamente 20,3% e 55,4% da população, respectivamente (BRASIL, 2021).

A obesidade, caracterizada por um acúmulo de gordura corporal do tipo androide/ginoide, proporciona um ambiente disfuncional ao tecido adiposo, que se encontra hipertrofiado, disfuncional, mais oxidativo e com maior produção de adipocinas pró-inflamatórias, que estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de dislipidemias, RI e distúrbios cardiovasculares (GREGG; SHAW, 2017). A alta taxa de lipólise dos adipócitos, que ocorre mediante a ação da lipase hormônio sensível (LHS), libera grande quantidade de ácidos graxos livres (AGL) estocados nos adipócitos, que serão direcionados para órgãos-alvo (fígado e músculo), como consequência, causam um aumento nos níveis de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) e acúmulo de triglicerídeos (TG) no fígado e pâncreas (MONTAGUE; O'RAHILLY, 2000). O excesso de tecido adiposo é um fator importante para a secreção das adipocinas interleucina fator 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que são responsáveis pelo aumento da inflamação e resistência à insulina (SALTIEL; OLEFSKY, 2017).

Além disso, os níveis elevados de VLDL e hipertrigliceridemia são as causas primárias de dislipidemia na obesidade e promovem direta e indiretamente desbalanço nos processos de síntese e oxidação AGL no fígado, favorecendo a progressão da DHGNA (SEZER, 2017).

## **2.2 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**

A DHGNA é o espectro de lesões relacionadas ao acúmulo excessivo de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos, em indivíduos sem histórico de ingestão de álcool relevante (FRANCQUE; WONG, 2022). A DHGNA apresenta um amplo espectro clínico-histológico que varia da esteatose simples, acúmulo de gordura sem evidência de lesão hepatocelular (balonização), até a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) caracterizada pela presença de esteatose, infiltrado inflamatório e balonização com ou sem a presença de fibrose. A EHNA pode progredir para formas mais graves como cirrose, falência hepática e carcinoma hepatocelular (MANTOVANI; DALBENI, 2022).

Bem como a maioria das alterações metabólicas, a DHGNA vem crescendo no mundo inteiro afetando cerca de 25,2% da população adulta mundial, 51,3% entre obesos e 42,5% entre indivíduos com SM (YOUNOSSI et al., 2016). Ademais, a DHGNA é considerada a manifestação hepática da SM

(KIM, C. H.; YOUNOSSI, 2008).

A gênese da DHGNA é muito complexa e ainda não totalmente compreendida. A teoria mais aceita para a instauração e agravamento da doença é a teoria dos múltiplos *hits*, que descreve que inicialmente os fatores de risco da SM (especialmente a obesidade e a RI) interagem em nível hepático causando insultos celulares (primeiro *hit*), que culminarão em acúmulo de ácidos graxos livres no interior de hepatócitos. O acúmulo destes AG desencadearão estresse oxidativo (segundo *hit*) e irão desequilibrar as vias lipogênicas hepáticas, favorecendo processos de lipogênese em detrimento de processos oxidativos, levando um maior acúmulo de gordura e promovendo uma ação lesiva e persistente no hepatócito, que favorece o surgimento de inflamação e o desenvolvimento de EHNA. Concomitantemente, neste fígado mais vulnerável, citocinas pró-inflamatórias advindas do tecido adiposo e microbiota e o estresse do retículo endoplasmático atuam de forma sinérgica (múltiplos *hits*) para proporcionar lesões hepatocelulares, inflamação e fibrose (TILG; MOSCHEN, 2010).

De forma mais recente, a teoria do múltiplo *crosstalk* tem ganhado evidência para explicar a gênese da DHGNA. Esta teoria destaca que a esteatose hepática relacionada à obesidade pode ser o resultado de um “*crosstalk*” desregulado orquestrado por variados hormônios entre múltiplos órgãos extra-hepáticos e o fígado em indivíduos obesos (WANG et al., 2022).

A maioria dos pacientes com DHGNA são assintomáticos, apesar de alguns pacientes apresentarem dor difusa, fadiga, hepatoesplenomegalia e dispepsia (MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014). O diagnóstico inicial se dá pela avaliação bioquímica da elevação de atividade das enzimas transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT), da gama glutamil transpeptidase -  $\gamma$ GT e da fosfatase alcalina - FAL e, de modo mais específico, por métodos de imagem (ultrassonografia, espectroscopia por ressonância magnética) e por biopsia hepática, que constitui o padrão ouro de diagnóstico (JENNISON et al., 2019).

Histologicamente, o fígado é considerado esteatótico quando apresenta acúmulo de gordura em pelo menos 5% dos hepatócitos, enquanto que a EHNA é caracterizada pela presença de esteatose e inflamação hepática com lesão hepatocitária (balonização), com ou sem fibrose (EASL-EASD-EASO, 2016).

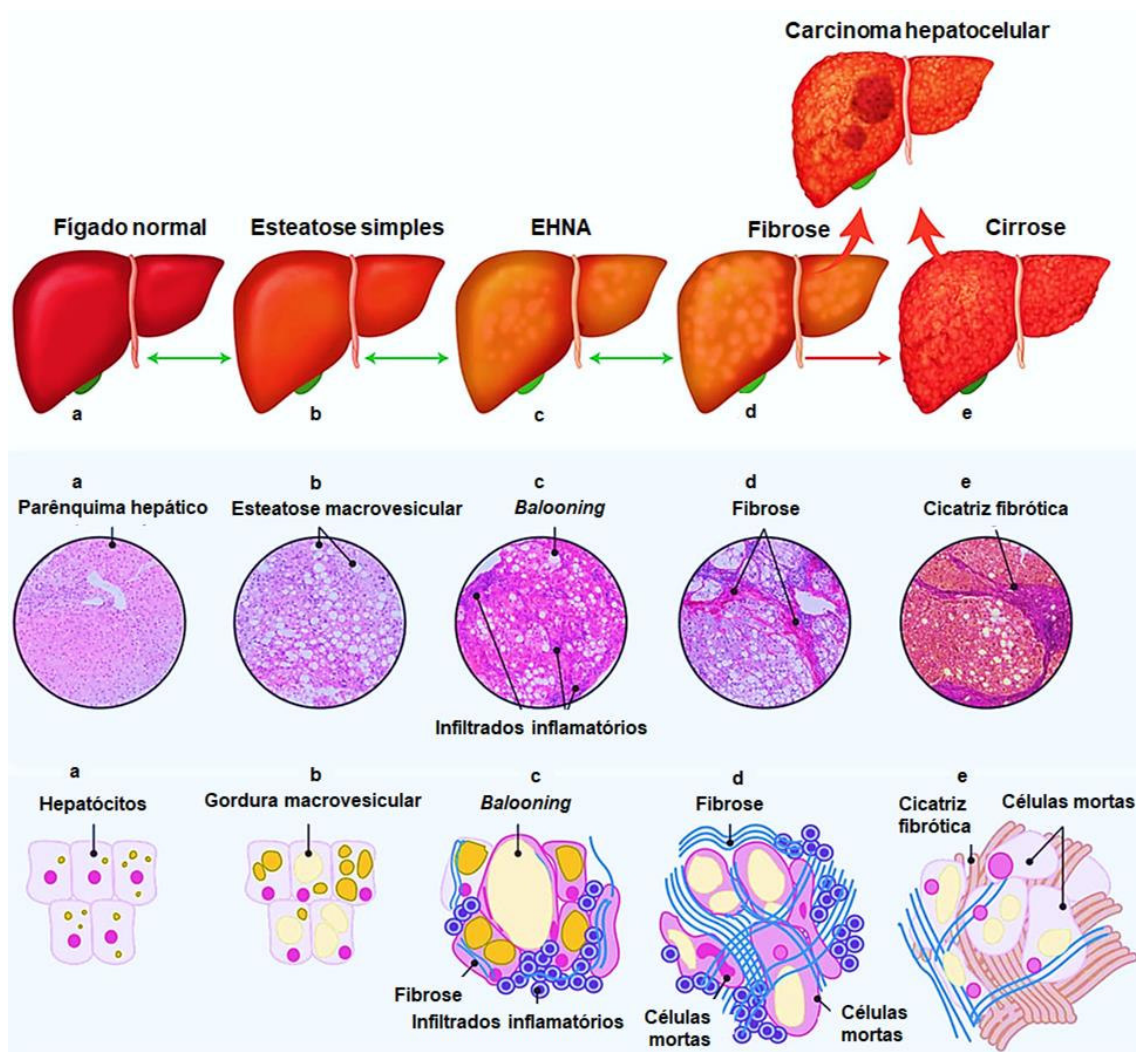
A esteatose hepática pode ser classificada como macro- ou microvesicular. A macrovesicular é a mais predominante e caracterizada pela presença de um grande e único vacúolo de gordura que desloca o núcleo do hepatócito para a periferia, enquanto que a microvesicular é formada por pequenos e numerosos vacúolos de gordura sem a descentralização do núcleo. Em via de regra, a esteatose microvesicular está relacionada a prejuízos no processo de  $\beta$ -oxidação mitocondrial e a uma maior probabilidade de evolução para uma EHNA (KLEINER, D. E.; MAKHLOUF, 2016).

Além da classificação do tipo de esteatose, outros parâmetros também são avaliados em cortes histológicos hepáticos (KLEINER, D. E., 2017), tais como:

- Inflamação: presença de infiltrados de células mono- e polimorfonucleares;
- Balonização: degeneração caracterizada por hepatócitos arredondados por conta de alterações da permeabilidade celular. Encontrado em casos de EHNA com maior risco de evolução para fibrose;
- Fibrose: acúmulo de matriz extracelular composta principalmente por colágeno, é produzida pelas células estreladas hepáticas após a lesão celular.

A principal classificação histológica da DHGNA utilizada clinicamente é o escore numérico de atividade (NAS), que é definido pela soma não ponderada dos escores para esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização (0-2). A fibrose é incluída neste escore e avaliada em separado. Os valores da soma podem variar de 0 a 8 em que  $NAS \geq 5$  é associado ao diagnóstico de EHNA, enquanto  $NAS \leq 3$  somente esteatose (KLEINER et al., 2005; EASL-EASD-EASO, 2016).

Apesar de ser uma doença com alta prevalência, as agências de vigilância sanitária globais não autorizam nenhum tratamento farmacológico específico para o controle da DHGNA (RINELLA, 2015). Desta forma, medidas terapêuticas não farmacológicas são indicadas, tais como prática de atividade física e intervenções nutricionais.



**Figura 1. Progressão da DHGNA e principais achados histológicos.** Adaptado de RUISSEN et al. (2020).

### 2.3 Intervenções dietéticas para o controle de doenças metabólicas

A alimentação é uma das principais formas de prevenir e reduzir patologias como a obesidade e o DM2. De fato, medidas de intervenção dietéticas associadas a mudanças comportamentais são as formas mais eficazes para garantir o controle destas doenças (TIMLIN et al., 2020).

Atualmente, existem diversos tipos de dietas que levam a perda ponderal, dentre elas: a dieta do mediterrâneo, jejum intermitente, dietas com restrições de carboidratos como as dietas *low carb* e as dietas cetogênicas (CASTRO-BARQUERO et al., 2020). Apesar de algumas destas intervenções e estratégias dietéticas serem amplamente conduzidas, não é sabido quais destas intervenções são realmente eficazes e seguras para o paciente.

São sólidas as evidências que suportam que o aumento na ingestão de CHO, especialmente os de alto índice glicêmico, induzem RI, que configura um importante fator de gênese para desordens metabólicas e cardiovasculares como obesidade, DM2, hipertensão e acidente vascular encefálico (BHARDWAJ; O'KEEFE; O'KEEFE, 2016). Uma meta-análise realizada por MENG et al. (2021) constatou que um maior consumo de bebidas com açúcares de adição aumenta em 27% o risco para o desenvolvimento de DM2, em 9% de doenças cardiovasculares e em 10% para outras causas de mortalidade. Neste sentido, dietas restritivas da ingestão de carboidratos assumem um importante papel para a redução do peso corporal, melhoria do perfil glicêmico, lipídico e dos níveis pressóricos e de outras doenças endócrinas, como a DHGNA (BOLLA et al., 2019; WALTON et al., 2019; WATANABE et al., 2020).

A dieta cetogênica é caracterizada por um alto teor de gorduras, adequada em proteínas e baixo teor de carboidratos e foi desenvolvida para mimetizar, em nosso organismo, os efeitos bioquímicos do jejum, mantendo um estado de anabolismo constante (VEECH, 2004).

Esta dieta foi primariamente concebida como uma alternativa terapêutica para o tratamento infantil de crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas não responsivas ao tratamento medicamentoso, por mimetizar um estado de cetose no organismo, que diminui a excitabilidade neural e conseqüentemente controla as crises convulsivas. Atualmente, esta intervenção nutricional tem sido mais utilizada para controle de peso e tem sido proposta como benéfica em diversas condições clínicas como: obesidade, resistência à insulina, DM2 e até câncer (SASLOW et al., 2017; BOLLA et al., 2019; ZOU et al., 2020).

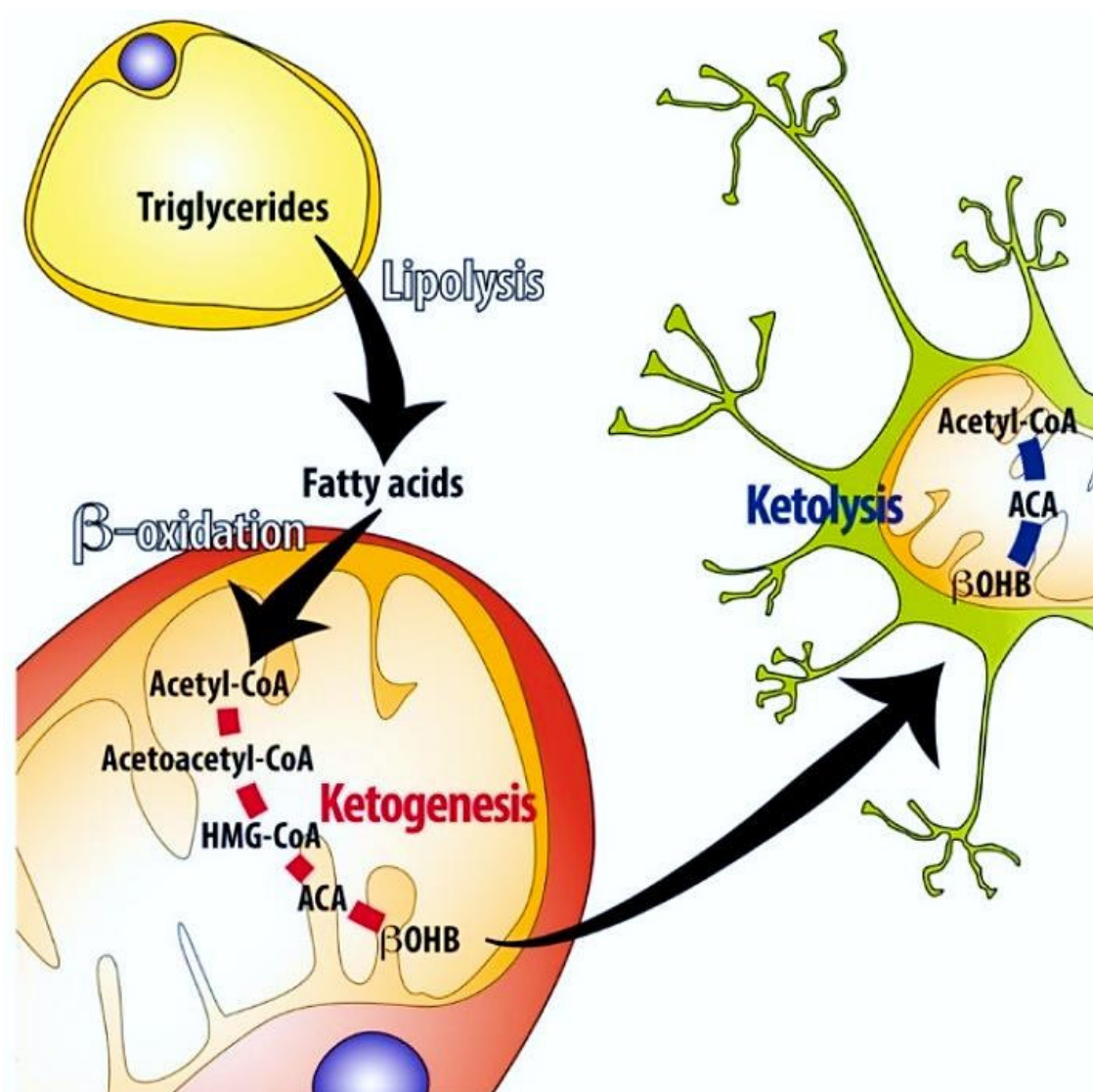
Em via de regra, a DC clássica é constituída por um alto teor de gordura, principalmente triglicerídeos de cadeia longa, que corresponde a cerca de 90% do valor calórico total da dieta, baixo teor de carboidrato e teor adequado de proteínas, sendo o mínimo de 1g/kg/dia. A prescrição da dieta deve ser feita por nutricionistas de modo individualizado de acordo com o objetivo e as necessidades energéticas do paciente. A dieta é realizada nas proporções 3:1 ou 4:1 (g de gordura : g de carboidrato e proteína) e podem ser alteradas de acordo com a resposta clínica e a cetose do indivíduo (FREEMAN et al., 2009).

Atualmente, diversas variantes da DC clássica foram desenvolvidas com o objetivo de favorecer a aderência do paciente à intervenção, melhorar a palatabilidade, aumentar a diversidade de alimentos ofertados e reduzir os efeitos adversos. São elas:

- **Dieta de Atkins modificada:** possui cerca de 60% do valor calórico total constituída por gordura e sendo livre a quantidade de calorias. É a DC mais liberal, de fácil aderência e maior variedade de alimentos palatáveis;
- **Dieta cetogênica com triglicerídeos de cadeia média:** possui 70 a 75% do valor calórico total constituído por óleos ricos em triglicerídeos de cadeia média (*e.g.* óleo de coco e de palma) e permite um aumento da quantidade de proteínas e carboidratos;
- **Dieta de baixo índice glicêmico:** permite a ingestão diária de 40 a 60g de carboidratos de baixo índice glicêmico ao dia, o que corresponde a aproximadamente 10% do valor calórico.

Baixos níveis de glicose sanguínea, decorrentes de um jejum prolongado, ou de uma dieta rica em gorduras, como é o caso da DC, causam uma resposta no pâncreas que libera o glucagon na corrente sanguínea, responsável por estimular a cetogênese. Nos adipócitos, esta maior oferta de lipídeos, estimula o hormônio lipase sensível (LHS) a realizar a lipólise dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo e conseqüentemente os níveis de AG na circulação (ARAFAT et al., 2013).

Os AG seguem em direção ao fígado que dará início a produção dos corpos cetônicos, que serão utilizados como principal fonte energética do corpo. Os AG serão convertidos nas mitocôndrias em acetil-CoA pelo processo de  $\beta$ -oxidação e serão desviados para cetogênese, que irá gerar os corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato. Na mitocôndria, que possui em abundância a enzima tioforase, os corpos cetônicos são convertidos de volta em Acetil-CoA, para serem oxidados no ciclo de Krebs e, por conseguinte, produzirem energia. Devido à alta solubilidade, os corpos cetônicos são difundidos diretamente na corrente sanguínea, em direção a tecidos como: músculos, coração e cérebro, servindo de fonte de energia para esses tecidos (LONGO et al., 2019).



**Figura 2. Produção de corpos cetônicos.** Por meio da lipólise são liberados os ácidos graxos que seguem em direção ao fígado e na mitocôndria ocorre o processo de cetogênese. Os ácidos graxos são convertidos em acetil-coA por meio da  $\beta$ -oxidação nos produtos finais acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato. Estes corpos cetônicos são exportados para o sangue e encaminhados para órgãos-alvo que conseguem convertê-los novamente em acetil-coA para que então possam ser oxidados no Ciclo de Krebs e formar ATP. Fonte: (LONGO et al., 2019).

Apesar da DC já ser bem consolidada como uma estratégia terapêutica eficiente para o controle de epilepsia, seus efeitos sobre o metabolismo humano ainda são controversos. Embora ela tenha ganho destaque na prática clínica por referir melhora em alguns parâmetros metabólicos (e.g. perda de peso, melhora na resistência à insulina), outras pesquisas mostram que ela acarreta prejuízos como dislipidemias, danos hepáticos (e.g. esteatose), sem causar perda ponderal (ELLENBROEK et al., 2014; COOPER et al., 2018; PARK et al., 2020). Alguns artigos evidenciando esta controvérsia se encontram descritos na



tabela 1 abaixo:

**Tabela 1. Principais achados após consumo de dieta cetogênica**

	<b>Resultados</b>	<b>Referências</b>
<b>Peso</b>	Perda de peso	(JORNAYVAZ et al., 2010; HUANG, J. et al., 2019; HER et al., 2020)
	Ganho ou ausência de perda de peso	(BURCELIN et al., 2002; BORGHJID; FEINMAN, 2012; BROWNLOW et al., 2013; COOPER et al., 2018)
<b>Glicemia/RI</b>	Aumento ou sem alteração	(SUMITHRAN et al., 2013; NEWMAN et al., 2017; COOPER et al., 2018; GRANDL et al., 2018).
	Redução	(BADMAN et al., 2009; HOLLAND et al., 2016; ZHANG, X. et al., 2016; DOURIS et al., 2017; ROSENBAUM et al., 2019; HER et al., 2020; LUUKKONEN et al., 2020)
<b>Perfil lipídico</b>	Aumento ou sem alteração	(GRANDL et al., 2018; ROSENBAUM et al., 2019)
	Redução	(BADMAN et al., 2009; WALTON et al., 2019; LUUKKONEN et al., 2020),
<b>DHGNA</b>	Aumento	(KLEINER, D. E.;

		MAKHLOUF, 2016; ZHANG et al., 2018; ZHANG et al., 2020)
	Redução	(TENDLER et al., 2007; PÉREZ-GUISADO; MUÑOZ-SERRANO, 2011)

Uma dieta com restrição de carboidratos e restrição calórica pode ser uma abordagem para perda ponderal, um grande passo na melhora de condições patológicas como a DHGNA. Recomenda-se a pacientes diabéticos uma redução do consumo glicídico, elegendo as dietas com baixas concentrações de carboidratos como estratégias terapêuticas recomendáveis. Como já explicado anteriormente, dados de eficiência dessas dietas ainda são controversos, tornando-se necessário a realização de mais estudos para garantir a eficiência e segurança destas intervenções nutricionais.

### 3. JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial e é considerada um importante problema de saúde pública. Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de propor medidas eficazes no tratamento e controle da obesidade, sendo a intervenção dietética uma das formas consideradas mais relevantes. Ainda não existe um consenso na comunidade científica sobre uma composição dietética ideal capaz de proporcionar melhoras nos parâmetros como dislipidemia, resistência à insulina, controle glicêmico e perda de peso favorecendo desta forma a diminuição de risco para o desenvolvimento de doenças como síndrome metabólica, DM2 e doenças cardiovasculares.

Tendo em vista que a obesidade é elemento-chave na gênese de desordens metabólicas, como dislipidemias, RI e doença hepática gordurosa não alcoólica e levando em consideração que a perda ponderal está intimamente ligada a melhora desse complicador, a dieta cetogênica tem sido amplamente utilizada na prática clínica, devido ao seu potencial dietoterápico no tratamento dessa doença, porém esses resultados ainda são divergentes, deixando dúvidas a respeito do efeito metabólico causado pela intervenção nutricional com dieta cetogênica em modelo animal de obesidade induzida por dieta de cafeteria.

Assim, esperamos neste estudo caracterizar os efeitos da dieta cetogênica sobre a composição corporal, parâmetros metabólicos e fígado de camundongos obesos induzidos por dieta de cafeteria, bem como avaliar se a substituição da dieta de cafeteria por uma dieta controle poderia acarretar em resultados equivalentes a dieta cetogênica.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar os efeitos subcrônicos da dieta cetogênica (DC) sobre o metabolismo geral e funcionamento hepático de camundongos com obesidade e outras disfunções metabólicas.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o desenvolvimento da obesidade e outras alterações metabólicas induzidas pela exposição à dieta de cafeteria em camundongos;
- Avaliar a eficácia da dieta cetogênica em controlar as disfunções morfométricas e metabólicas induzidas pela dieta obesogênica;
- Avaliar o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não-alcoólica induzida pela exposição à dieta de cafeteria e a eficácia da dieta cetogênica em controlar as alterações hepáticas.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Dietas

Três tipos diferentes de rações foram utilizados neste projeto, são elas: dieta controle (CTR), dieta de cafeteria (CAF) e dieta cetogênica (DC). A dieta CTR utilizada foi a ração padrão para roedores Nuvilab CR-1<sup>®</sup> (Nuvital), a dieta DC (manufaturada por Prag Soluções Comércio e Serviços Ltda.) e a dieta CAF, que foi manufaturada a partir da adição de macronutrientes à dieta CTR pulverizada (Prag Soluções Comércio e Serviços Ltda.).

A dieta CAF era constituída em 37,5% por ração controle triturada, 25% de amendoim triturado, 25% de chocolate ao leite (Garoto<sup>®</sup>, Nestlé) e 12,5% de biscoitos triturados (Maizena<sup>®</sup>, Bauducco), que foram misturados e moldados para formar pellets semelhantes à ração CTR. Em adição à ração CAF foram oferecidos aos animais itens alimentares de sabor agradável compreendendo petiscos (Doritos<sup>®</sup>, Cheetos<sup>®</sup> e Baconzitos<sup>®</sup>, Elma Chips), bolo sabor brigadeiro, chocolate ou morango (Santa Edwiges), biscoitos wafer sabor limão, chocolate ou morango (Amori<sup>®</sup>, Richester), mais duas mamadeiras, sendo uma com água e outra com refrigerante (Coca-Cola<sup>®</sup> ou Guaraná Antártica<sup>®</sup>) (VANZELA et al., 2010).

A composição centesimal e densidade energética das demais dietas se encontram descritas na Tabela 3. A densidade energética dos petiscos foi calculada usando informações de macronutrientes fornecidas pelo fabricante.

**TABELA 2. Composições centesimais das dietas padrão, cetogênica e cafeteria.**

	<b>Dieta Padrão</b>	<b>Dieta cetogênica</b>	<b>Dieta de Cafeteria</b>
<b>Carboidratos</b>	55,4%	3%	41,2%
<b>Proteínas</b>	21%	8,6%	22,3%
<b>Lipídeos</b>	5,2%	75,1%	24,5%
<b>Fibras</b>	7%	4,8%	6%
<b>Valor energético</b>	350 Kcal/100g	724 Kcal/100g	474,5Kcal/100g

**TABELA 3. Composição nutricional dos itens alimentares adicionados à dieta de cafeteria, conforme indicado pelos fabricantes do produto**

<b>Itens</b>	<b>CHO*</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Fibras</b>	<b>Valor energético</b>
<b>Doritos® (ElmaChips)</b>	0,60	0,05	0,23	0,05	5 Kcal/g
<b>Baconzitos® (Elma Chips)</b>	0,55	0,05	0,30	0	5 Kcal/g
<b>Cheetos® (ElmaChips)</b>	0,68	0,08	0,22	0	5,01 Kcal/g
<b>Bolos (Santa Edwiges)</b>	0,575	0,05	0,125	0	3,63 Kcal/g
<b>Amori® (Richester)</b>	0,67	0,03	0,27	0	5 Kcal/g
<b>Refrigerante (Coca-cola®)</b>	0,11	0	0	0	0,40 Kcal/mL
<b>Refrigerante (Guaraná Antártica®)</b>	0,10	0	0	0	0,39 Kcal/mL

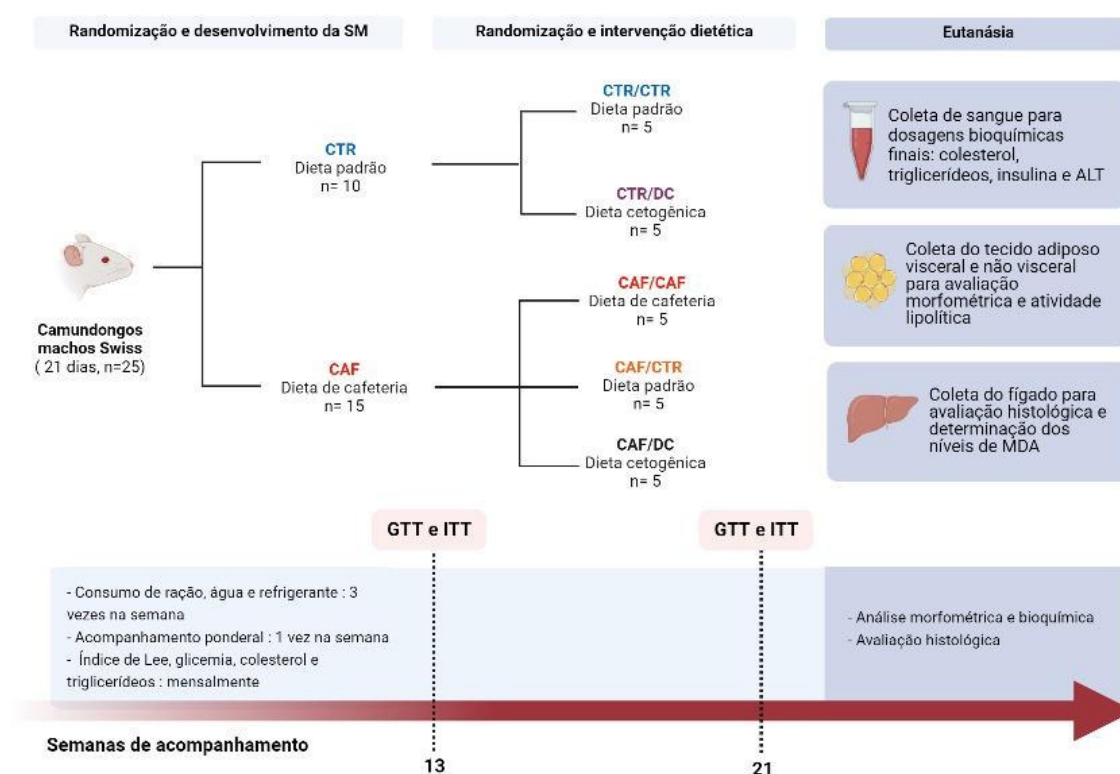
\* CHO: Carboidratos

## 5.2 Animais e desenho experimental

Para este estudo foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* linhagem Swiss saindo do desmame (21 dias; machos; n=25) oriundos do Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação da UFMA em gaiolas de polietileno forradas com xilana e (máximo de 5 animais/gaiola), em ambiente controlado ( $23 \pm 2$  °C; umidade 60%; ciclo claro/escuro de 12h) e com livre acesso à água, dietas e demais itens alimentares. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) sob o parecer número 23115.038755/2018-22.

O desenho experimental encontra-se esquematizado na Figura 2 abaixo. Ao sair do desmame os camundongos foram randomizados uniformemente pelo peso em grupos experimentais que foram alimentados com ração CTR (n=10) ou CAF (n=15) pelo período de 12 semanas. Após este período, estes grupos foram novamente redistribuídos em 5 grupos (n=5) acompanhados por mais 8 semanas que receberam dieta CRT, CAF ou DC, como descritos a seguir:

- CTR/ CTR: 22 semanas de dieta padrão;
- CTR/ DC: 12 semanas de dieta padrão + 10 semanas de dieta cetogênica;
- CAF/ CTR: 12 semanas de dieta de cafeteria + 10 semanas de dieta padrão;
- CAF/ CAF: 22 semanas de dieta de cafeteria;
- CAF/ DC: 12 semanas de dieta de cafeteria + 10 semanas de dieta cetogênica.



**Figura 3. Esquema do desenho experimental.** Fonte: Autora.

Durante todo o experimento, o peso corporal, consumo alimentar e hídrico foram monitorados semanalmente (3 vezes/semana) para avaliação do progresso ponderal e consumo energético. Mensalmente, foram realizados o

índice de massa corpórea para acompanhamento da obesidade. Em paralelo, alíquotas de sangue periférico foram coletadas a partir de seções da cauda para avaliação da glicemia de jejum e pós-prandial em glicosímetros e separação do soro para avaliação dos níveis lipídicos (colesterol total e triglicerídeos) utilizando kits laboratoriais.

Com dois meses de acompanhamento com a dieta controle ou cafeteria, os animais foram submetidos aos testes de tolerância à glicose (GTT) e insulina (ITT). Na semana anterior ao período determinado para eutanásia (8 semanas pós-substituição de dietas), os animais foram novamente submetidos aos mesmos testes. Nos dias de eutanásia, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas, anestesiados (solução de cetamina/xilazina 150:10 mg/kg) e laparotomizados para coleta de sangue, coxins adiposos (gorduras retroperitoneal, periepididimal e mesentérica) e fígado.

O sangue coletado foi utilizado para as determinações bioquímicas finais (colesterol total, triglicerídeos, glicemia e atividade da enzima alanina aminotransferase - ALT) e dosagem hormonal de insulina. A partir dos níveis de insulina, glicemia de jejum e triglicerídeos foram calculados os índices HOMA-IR e TyG para avaliação indireta de resistência à insulina.

Por fim, os fígados coletados foram pesados e alíquotas foram separadas para avaliação de estresse oxidativo ou conservadas em formol tamponado para posterior avaliação histopatológica.

### **5.3 Avaliações bioquímicas**

A avaliação dos níveis glicêmicos em estados de jejum e pós-prandial se deu em glicosímetros (Accu-chek Active<sup>®</sup>, Roche).a partir de alíquotas de sangue periférico coletadas por seções da cauda dos animais. As dosagens bioquímicas de colesterol total, triglicerídeos e ALT foram realizadas em soro obtido por centrifugação do sangue (3500rpm; 10min) e avaliadas por métodos colorimétricos segundo os métodos descritos nos kits laboratoriais (Labtest<sup>®</sup>, Brasil). A insulina sérica foi dosada por método imunoenzimático segundo as especificações descritas pelo fabricante (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).



#### **5.4 Teste oral de tolerância à glicose (GTT)**

Os animais foram submetidos ao GTT após o tratamento inicial de 2 meses com dieta controle ou cafeteria e após 8 semanas de tratamento com as diferentes dietas. Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 8h, em seguida foram imobilizados para administração oral de glicose (2g/kg) ofertadas por gavagem. Alíquotas de sangue foram coletadas por seções na cauda nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 minutos após à administração de glicose para avaliação dos níveis glicêmicos em glicosímetro. A partir das aferições glicêmicas foi calculada a área sobre a curva do gráfico para avaliação de tolerância à glicose (FLISTER et al., 2018).

#### **5.5 Testes de tolerância à insulina (ITT)**

Para o ITT, os animais em estado alimentado receberam um *bolus* por via intraperitoneal de 1UI/Kg de insulina e, após a administração, foram avaliados os níveis glicêmicos com glicosímetro nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos. O quadro de tolerância à insulina foi verificado pela curva de decaimento dos níveis de glicose observados nos diferentes tempos de coleta (FLISTER et al., 2018).

#### **5.6 Análise histopatológica do fígado**

Amostras de fígado foram fixadas em solução 10% de formalina tamponada por 24 horas a temperatura ambiente e logo após foram conservadas em etanol a 70% por 20 dias e embebidas em parafina. Para os cortes histológicos foram feitas seções de 5µm de espessura, a diferentes profundidades do tecido, avançando 50 µm de profundidade a cada nova face a ser seccionada. Os cortes foram corados por método de coloração hematoxilina/eosina e analisadas por três avaliadores às cegas para avaliação do grau de esteatose, esteatohepatite e inflamação (KLEINER et al., 2005).

#### **5.7 Avaliação de estresse oxidativo**

Amostras de fígado foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato 20mM contendo 140 mM KCl e 1 mM EDTA (pH 7,4; 1:10 p/v) e

centrifugado (750 x g; 10 min; 4 ° C) para separar o sobrenadante. Em seguida, 150 µL de sobrenadante foram adicionados a 300 µL de Ácido tricloroacético a 10% (Sigma- Aldrich, EUA) (resfriado) e ácido tiobarbitúrico 0,67% (Merck, Alemanha) em sulfato de sódio 7,1% e incubado em banho-maria (80 °C) por 25 min. A mistura foi arrefecida e o cromogênio rosa isolado por adição de butanol (2:1 v/v) seguida de centrifugação (3000 x g; 10 min). A quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada espectrofotometricamente em 535 nm. Para a curva de calibração utilizou-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma-Aldrich, EUA) como padrão e os níveis de TBARS foram expressos como µM de MDA/mg de proteína (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

## **5.8 Análise dos Resultados**

A análise estatística dos dados foi conduzida no software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., USA). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m e submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido por análise paramétrica ANOVA unidirecional (pós teste Newman-Keuls) ou teste t-Student com uma significância de  $p \leq 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

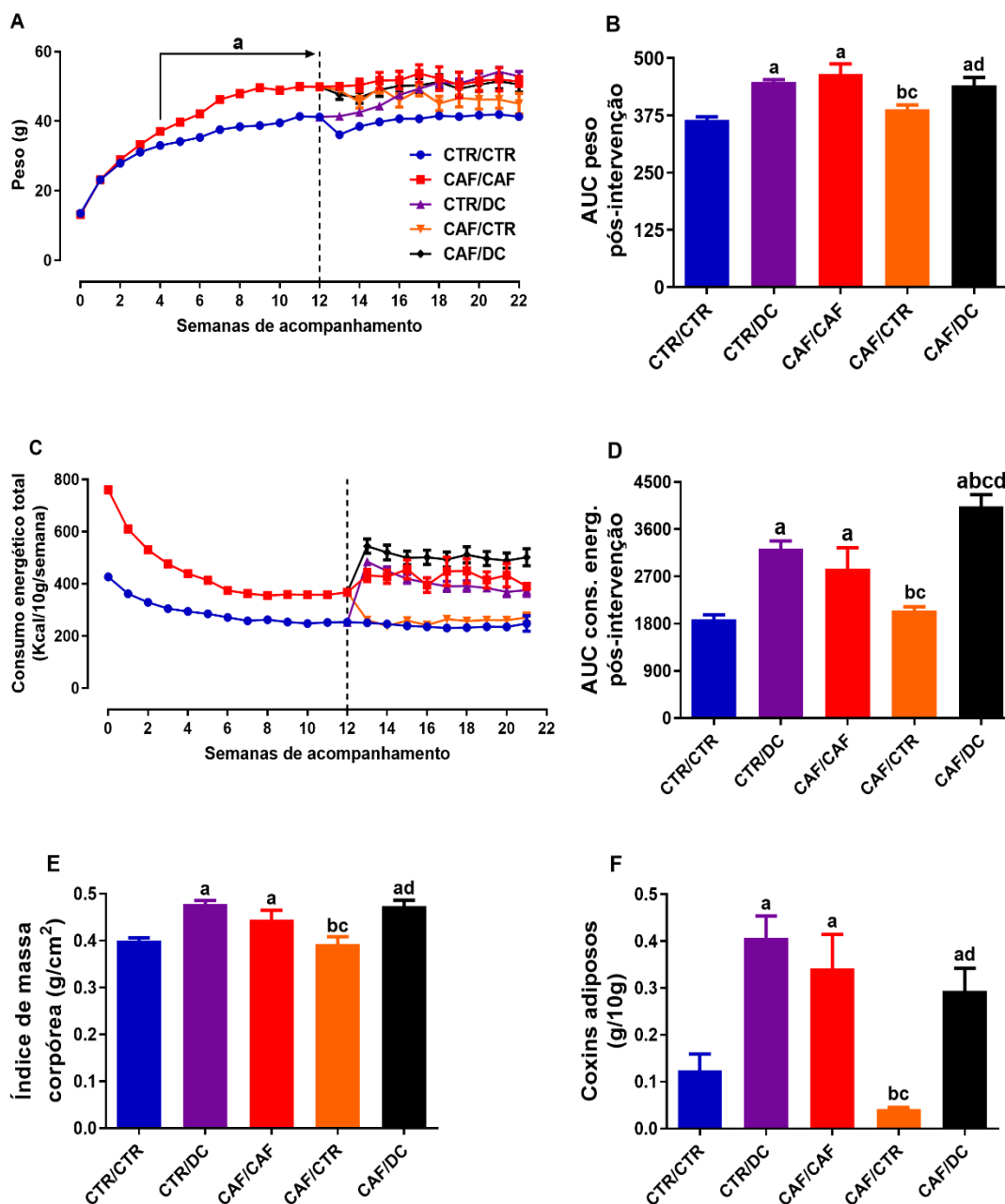
Os aumentos de prevalência/incidência da obesidade estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de diversas patologias como diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças cardiovasculares, que geram altas taxas de mortalidade e grandes custos de saúde pública (VILLARROYA et al., 2018; CERCATO; FONSECA, 2019). Em contrapartida, a perda ponderal leva a melhoria de diversas disfunções metabólicas. Diante disso, intervenções nutricionais emergem como estratégias relevantes na prevenção e manejo da obesidade e morbidades associadas (CASAS et al., 2018). Deste modo, nosso trabalho buscou avaliar se a dieta cetogênica atua como uma intervenção nutricional eficaz contra distúrbios metabólicos induzidos por uma dieta obesogênica e se a simples substituição desta dieta por uma alimentação balanceada poderia acarretar resultados equivalentes ou melhores que a dieta cetogênica.

O grupo CAF/CAF quando comparada ao CTR/CTR se mostrou efetivo em induzir aumento ponderal a partir da 4ª semana ( $33,3 \pm 0,43$  g vs.  $31,12 \pm 0,36$  g;  $p < 0,001$ ; Figura 4A), que persistiu por todo período de acompanhamento ( $464,4 \pm 22,74$  vs.  $365 \pm 7,03$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 4B). Em decorrência do elevado consumo energético ( $2849 \pm 400,2$  vs.  $1877 \pm 91,9$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 4C e 4D) além do aumento ponderal, os animais também apresentaram desenvolvimento de obesidade ( $0,44 \pm 0,02$  vs.  $0,39 \pm 0,007$  g/cm<sup>2</sup>;  $p < 0,0001$ ; Figura 4E); com acúmulo de depósitos adiposos viscerais e não-viscerais ( $0,341 \pm 0,07$  vs.  $0,124 \pm 0,03$  g/10g;  $p < 0,05$ ; Figura 4F).

O grupo de animais controle que passou a receber dieta cetogênica (CTR/DC) quando comparado ao grupo CTR/CTR apresentou elevação do peso ( $447,7 \pm 5,45$  g;  $p < 0,001$ ; Figura 4A), elevada ingestão energética ( $3234 \pm 139,1$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 4C e 4D), obesidade ( $0,478 \pm 0,007$  g/cm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ; Figura 4E) e acúmulo de massa adiposa ( $0,41 \pm 0,04$  g/10g;  $p < 0,01$ ; Figura 4F).

Por outro lado, a substituição da dieta CAF pela dieta controle (Grupo CAF/CTR) quando comparado ao grupo CAF/CAF foi eficiente em reverter o ganho ponderal ( $387,9 \pm 9,72$  g;  $p < 0,01$ ; Figura 4A), obesidade ( $0,3935 \pm 0,015$  g/cm<sup>2</sup>;  $p < 0,05$ ; Figura 4E) e acúmulo adiposo ( $0,04 \pm 0,003$  g/10g;  $p < 0,01$ ; Figura

4F), provavelmente por conta do baixo consumo energético ( $2046 \pm 78,43$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 4C e 4D). Por fim, os animais obesos que receberam dieta cetogênica (CAF/DC) apresentaram apenas elevação da ingesta energética ( $4033 \pm 226,3$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 4C e 4D) quando comparados ao seu grupo controle (CAF/CAF).



**FIGURA 4. Avaliação morfológica.** **A**, Peso dos animais (g); **B**, AUC do peso; **C**, Consumo energético (Kcal/10g/semanas), **D**, AUC do consumo energético pós-intervenção; **E**, IMC (g/cm<sup>2</sup>) e **F**, peso relativo (g/10g) dos coxins adiposos visceral e não visceral avaliados nos grupos experimentais que receberam somente dieta controle (CTR/CTR), dieta controle seguida de dieta cetogênica (CTR/DC), somente dieta de cafeteria (CAF/CAF), dieta de cafeteria seguida de dieta controle (CAF/CTR) e dieta de cafeteria seguida de dieta cetogênica (CAF/DC). Os pontos e barras representam média  $\pm$  EPM (One-Way ANOVA - Newman Keuls). As diferenças foram

consideradas quando  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo CTR/CTR, <sup>b</sup> ao grupo CTR/DC, <sup>c</sup> ao grupo CAF/CAF e <sup>d</sup> ao grupo CAF/CTR.

A maioria dos estudos pré-clínicos utiliza dietas com alto teor de gordura (*high fat diets*) ou açúcares de adição (principalmente frutose) como indutor de obesidade e alterações metabólicas, contudo as dietas CAF têm sido apontadas como modelos que mimetizam de forma mais fidedigna o consumo alimentar contemporâneo, caracterizado por diversidade de alimentos palatáveis, elevado aporte calórico e alto teor de carboidratos simples e/ou lipídeos (SAMPEY et al., 2011). A dieta CAF é eficiente em induzir obesidade (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019), dislipidemia (MBALLA et al., 2021), hiperglicemia, hiperinsulinemia (MARTÍN-GONZÁLEZ et al., 2020), e até anormalidades estruturais e funcionais em diferentes órgãos (e.g. coração, fígado, rim, pâncreas, tecido adiposo, pulmão, baço e intestino delgado), mesmo em diferentes tempos de indução e composições centesimais (HAZARIKA et al., 2016).

Como esperado, a dieta CAF teve sucesso em promover alterações morfométricas como aumento ponderal e obesidade central, panorama este replicado em diversos estudos (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019; MORAIS et al., 2019; AOUICHAT et al., 2020). Ademais, CASTRO et al. (2015) afirmam que a administração da CAF durante os primeiros meses de vida provoca instalação persistente do perfil obesogênico e às alterações morfométricas não são totalmente revertidas após substituição por uma dieta padrão.

Em contraponto a esta informação, em nosso estudo a substituição da dieta CAF por uma dieta padrão em animais com obesidade induzida desde o desmame (grupo CAF/CTR) se mostrou uma intervenção eficaz em reverter todo ganho ponderal e adiposo na vida adulta. Resultados semelhantes foram observados no estudo de REYNÉS et al. (2014) que utilizava uma dieta CAF composta por itens alimentícios diversos e com uma alta densidade energética para indução de obesidade, e após a substituição por 2 meses da dieta CAF pela dieta CTR observou-se uma normalização da obesidade e adiposidade, mas não da massa corpórea.

Esperávamos que a intervenção com a DC tivesse um desfecho semelhante, visto que diversos estudos relatam eficácia de dietas cetogênicas como estratégias para diminuição do peso corporal (JORNAYVAZ et al., 2010; HUANG, J. et al., 2019; HER et al., 2020). Entretanto, um panorama diferente foi

observado em nosso estudo, e os animais que receberam a DC acabaram ganhando peso e adiposidade independente de seu perfil ponderal pré-intervenção. Com menor frequência, há relatos na literatura de animais sadios que receberam DC e não perderam peso (BROWNLOW et al., 2013), de animais sadios que ganharam peso após a DC (BURCELIN et al., 2002; BORGHJID; FEINMAN, 2012; COOPER et al., 2018) e de animais previamente obesos que após a DC permaneceram com seu peso elevado (BADMAN et al., 2009). Aparentemente, uma elevação dos níveis de gordura (acima de 80%) e redução dos CHO (0%) nessas dietas, aumenta a secreção de leptina nos animais e induz o aumento de massa adiposa (BORGHJID; FEINMAN, 2012).

O apetite/sensação de saciedade são reguladas em nível hipotalâmico por diversos nutrientes e hormônios, tais como glicose, ácidos graxos livres, leptina, insulina, grelina, colecistoquinina (CCK), peptídeo semelhante a glucagon 1, peptídeo YY e polipeptídeo pancreático (SCHWARTZ et al., 2000). Já foi demonstrado que animais alimentados com dieta cetogênica tendem a um baixo consumo alimentar; isto por conta da redução de apetite e maior sensação de saciedade induzida pelo elevado teor de gorduras que compõe a dieta, manutenção da secreção de CCK pós-prandial e redução dos níveis de grelina (SUMITHRAN et al., 2013). Porém, esta situação de baixo consumo alimentar e consequente baixo aporte energético não foi observada em nossos animais, o que pode ter contribuído para o ganho de peso observado nos animais que receberam a DC durante o período de acompanhamento.

Sugere-se que o efeito antiobesogênico normalmente encontrado com a DC esteja relacionado com sua capacidade de: (1) reduzir o processo de glicólise ao favorecer a utilização de corpos cetônicos como fonte energética primária (WASTERLAIN et al., 2010); (2) promover a lipólise do tecido adiposo (KATHER et al., 1987); (3) reduzir os níveis de insulina (HER et al., 2020); (4) aumentar o gasto energético como consequência de maior secreção de hormônios tireoidianos e catecolaminas (HALL et al., 2016); e (5) reduzir o quociente respiratório de repouso, refletindo maior oxidação de gorduras para produção energética (TAGLIABUE et al., 2012).

No que se refere à avaliação do eixo glicose-insulina, os animais alimentados exclusivamente com a dieta CAF (CAF/CAF) quando comparado ao seu controle (CTR/CTR) apresentaram hiperglicemia em estado de jejum (435,8

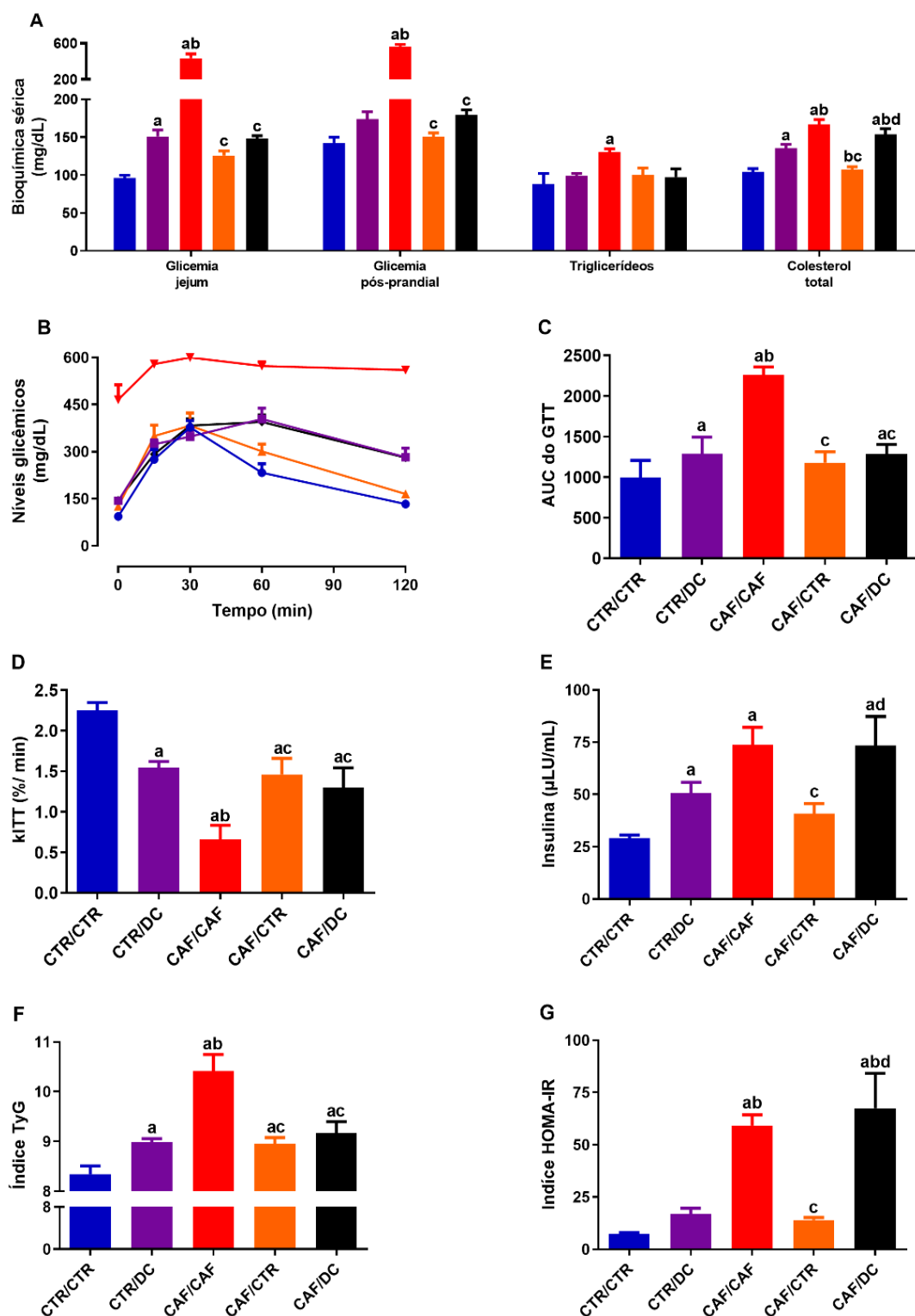
$\pm 48,42$  vs.  $96,13 \pm 3,73$  g/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A) e no estado alimentado ( $565,5 \pm 23,3$  vs.  $142,4 \pm 7,47$  g/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A), hipercolesterolemia ( $166,9 \pm 6,51$  vs.  $104,2 \pm 4,53$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A) e aumento dos níveis de triglicerídeos ( $130,6 \pm 4,2$  vs.  $88,21 \pm 13,7$  mg/dL;  $p < 0,05$ ; Figura 5A). Ademais, o grupo obeso (CAF/CAF) apresentou intolerância à glicose ( $2266 \pm 37,87$  vs.  $998,8 \pm 78,72$ ;  $p < 0,0001$ ; Figuras 5B e 5C), hiperinsulinemia ( $73,82 \pm 8,3$  vs.  $29,11 \pm 1,55$   $\mu$ LU/mL;  $p < 0,001$ ; Figura 5D), resistência à insulina caracterizada por redução do kITT ( $0,66 \pm 0,17$  vs.  $2,25 \pm 0,09$  %/min;  $p < 0,0001$ ; Figura 5E) e aumento do índice TyG ( $10,41 \pm 0,33$  vs.  $8,34 \pm 0,16$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 5F) e índice HOMA-IR ( $59,19 \pm 5,1$  vs.  $7,38 \pm 0,63$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 5G).

O grupo CTR/DC quando comparado ao CTR/CTR apresentou aumento da glicemia de jejum ( $165,8 \pm 11,78$  mg/dL;  $p < 0,05$ ; Figura 5A), hipercolesterolemia ( $135,4 \pm 5,1$  mg/dL;  $p < 0,01$ ; Figura 5A), hiperinsulinemia ( $50,82 \pm 4,95$   $\mu$ LU/mL;  $p < 0,05$ ; Figura 5D) e menor responsividade à insulina, caracterizada pela redução do kITT ( $1,54 \pm 0,07$  %/min;  $p < 0,01$ ; Figura 5E) e aumento do TyG ( $8,98 \pm 0,07$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 5F).

Por sua vez, a substituição da dieta de cafeteria por uma dieta controle (CAF/CTR) quando comparado ao grupo CAF/CAF foi capaz de reverter a hiperglicemia de jejum ( $125,8 \pm 6,00$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A) e pós-prandial ( $150,3 \pm 5,155$  vs.  $565,5 \pm 23,3$  g/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A) e reduzir os níveis de colesterol ( $107 \pm 4$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A), sem, no entanto, reduzir os níveis de triglicerídeos (Figura 5A). Além disso, a retirada da dieta CAF reverteu a intolerância à glicose  $1179 \pm 54,6$ ;  $p < 0,0001$ ; Figuras 5B e 5C), reduziu os níveis de insulina ( $40,88 \pm 4,7$   $\mu$ LU/mL;  $p < 0,05$ ; Figura 5D), melhorou a sensibilidade à insulina ( $1,46 \pm 0,19$  %/min;  $p < 0,01$ ; Figura 5E) e diminuiu a RI nos índices TyG ( $8,95 \pm 0,12$  vs.  $10,41 \pm 0,33$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 5F) e HOMA-IR ( $14,00 \pm 1,19$  vs.  $59,19 \pm 5,1$ ;  $p < 0,001$  Figura 5G).

O grupo obeso (CAF) que recebeu dieta cetogênica (CAF/DC) quando comparado ao CAF/CAF atenuou os níveis glicêmicos em jejum ( $148,1 \pm 3,75$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A) e pós-prandial ( $179,5 \pm 6,47$  mg/dL;  $p < 0,0001$ ; Figura 5A), porém não modificou os níveis lipídêmicos (Figura 5A). Outrossim, melhorou a sensibilidade à glicose ( $1283 \pm 45,66$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 5B e 5C), não alterou os níveis insulinêmicos (Figura 5D), porém melhorou a sensibilidade

à insulina ( $1,3 \pm 0,24$  %/min;  $p < 0,05$ ; Figura 5E) e atenuou a RI pelo TyG ( $9,17 \pm 0,22$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 5F).



**FIGURA 5. Avaliação do perfil glicolipídico e resistência à insulina. A**, bioquímica sérica (mg/dL); **B**, níveis glicêmicos (mg/dL); **C**, AUC do GTT; **D**, kITT (%/min); **E**, insulina ( $\mu$ LU/mL); **F**, TyG e **G**, HOMA-IR avaliados nos grupos experimentais que receberam somente dieta controle (CTR/CTR), dieta controle seguida de dieta cetogênica (CTR/DC), somente dieta de cafeteria



(CAF/CAF), dieta de cafeteria seguida de dieta controle (CAF/CTR) e dieta de cafeteria seguida de dieta cetogênica (CAF/DC). Os pontos e barras representam média  $\pm$  EPM (One-Way ANOVA - Newman Keuls). As diferenças foram consideradas quando  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo CTR/CTR, <sup>b</sup> ao grupo CTR/DC, <sup>c</sup> ao grupo CAF/CAF e <sup>d</sup> ao grupo CAF/CTR.

Todos esses efeitos encontrados após utilização da dieta CAF estão interligados e podem ser explicados a devido a sobrecarga alimentar de carboidratos simples, principalmente glicose e frutose, e gorduras trans e saturadas, que em conjunto perturbam severamente diversas vias de sinalização metabólica (BUYUKDERE; GULEC; AKYOL, 2019).

Particularmente, os componentes da CAF atuam estimulando a lipogênese *de novo*, favorecendo a síntese de lipídeos e inibindo a oxidação dos mesmos (MANCO, 2017); estimulando as via da glicero- e gliconeogênese, que contribuem respectivamente para elevação dos níveis plasmáticos de glicerol e glicose (CHAVES et al., 2012); e, devido a sua alta palatabilidade, induzindo mecanismos de adaptação neural, sensação de prazer, ativação do sistema de recompensa e hiperfagia (MACEDO; FREITAS; TORRES, 2016). Os produtos destas vias metabólicas são responsáveis pela dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, estresse oxidativo e RI, que são fatores causais para o ganho de peso, acúmulo adiposo, obesidade, DHGNA e DM2 (HAZARIKA et al., 2016).

No que se refere à DC, mesmo com toda relevância clínica como alternativa eficiente para redução de peso, os desfechos metabólicos apresentados após esta intervenção bem como possíveis mecanismos de ação ainda são bem diversos e/ou desconhecidos. Em relação ao metabolismo da glicose, estudos apontam um papel anti-hiperglicemiante (BADMAN et al., 2009; HOLLAND et al., 2016; ZHANG, X. et al., 2016; DOURIS et al., 2017; HER et al., 2020; LUUKKONEN et al., 2020), redutor da secreção de insulina (BADMAN et al., 2009; HER et al., 2020) e de resistência à insulina (BADMAN et al., 2009; DOURIS et al., 2017; ROSENBAUM et al., 2019) da DC, enquanto outros não apontaram nenhum benefício (SUMITHRAN et al., 2013; NEWMAN et al., 2017; COOPER et al., 2018; GRANDL et al., 2018).

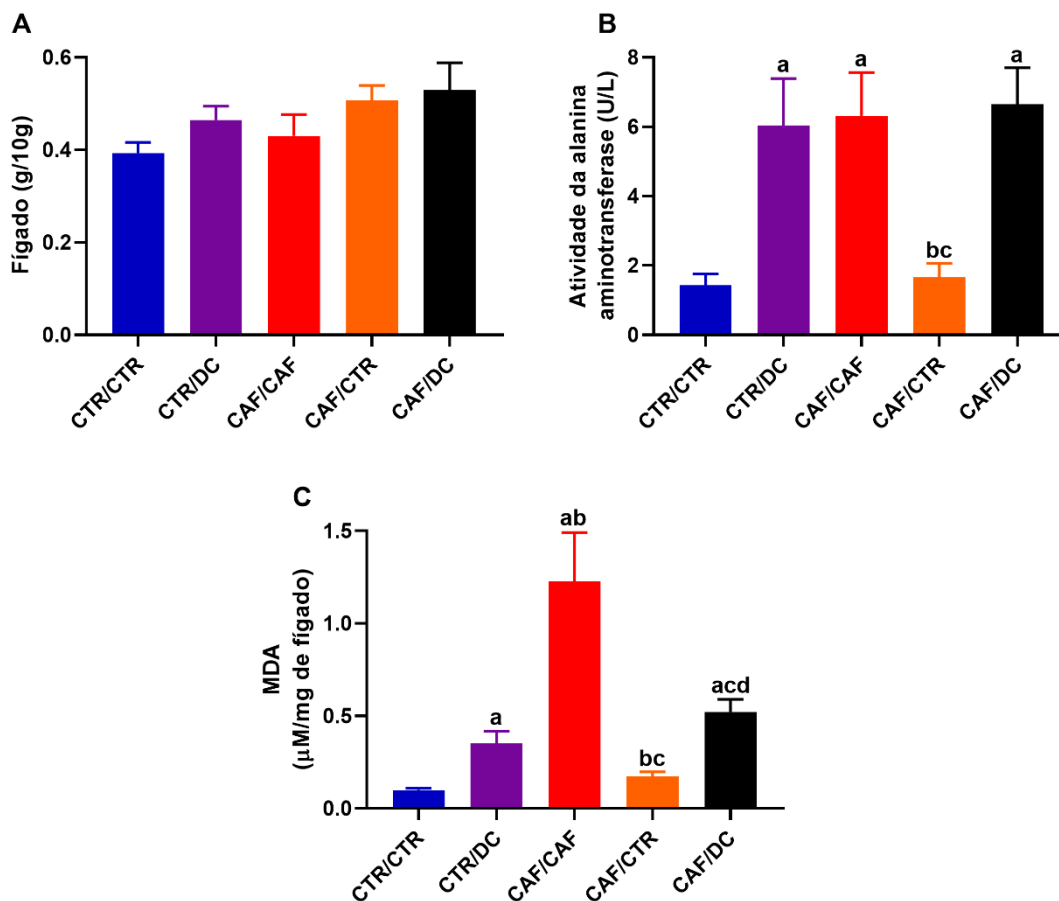
No perfil lipídico também observamos uma vasta diversidade de efeitos, com alguns reduzindo os níveis de triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos (BADMAN et al., 2009; WALTON et al., 2019; LUUKKONEN et al., 2020), enquanto outros não alteram/aumentam os níveis lipêmicos (GRANDL et al., 2018; ROSENBAUM et al., 2019).

Dentre os principais mecanismos de ação pelos quais a DC promove seus efeitos metabólicos, destacam-se: (1) ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que atua na homeostasia do eixo glicose-insulina (KENNEDY et al., 2007; ACCURSO et al., 2008); (2) inibição da expressão de enzimas relacionadas a síntese de ácidos graxos, como a esteroil coenzima A dessaturase (SCD-1), bem como aumento da expressão de marcadores envolvidos na oxidação dos mesmos, como o receptor ativado por proliferadores peroxissomais tipo alfa (PPAR $\alpha$ ) e a acil-coA desidrogenase (BADMAN et al., 2009); (3) aumento da expressão do coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1 $\alpha$ ), importante regulador da atividade e biogênese mitocondrial, termogênese, metabolismo oxidativo muscular, gliconeogênese e secreção de insulina (JORNAYVAZ et al., 2010; BESSEICHE et al., 2015); (4) aumento da secreção de leptina e redução da insulina (BORGHJID; FEINMAN, 2012; HER et al., 2020).

Por fim, avaliamos o impacto das intervenções nutricionais sobre o fígado. Nenhum dos grupos analisados demonstrou alteração de massa dos fígados (Figura 6A). Os animais CAF/CAF quando comparados ao seu controle (CTR/CTR) apresentaram um grau de dano hepático marcado pelo aumento da atividade da enzima alanina aminotransferase - ALT ( $6,31 \pm 1,25$  vs.  $1,43 \pm 0,33$  U/L;  $p < 0,01$ ; Figura 6B), lipoperoxidação ( $1,23 \pm 0,26$  vs.  $0,09 \pm 0,01$   $\mu\text{M}/\text{mg}$  de fígado;  $p < 0,0001$ ; Figura 6B) e esteatose hepática ( $1,88 \pm 0,12$  vs. 0;  $p < 0,0001$ ; Figura 6B).

O grupo CTR/DC quando comparado ao CTR/CTR também apresentou aumento da ALT ( $6,03 \pm 1,35$  U/L;  $p < 0,05$ ; Figura 6B), lipoperoxidação ( $0,35 \pm 0,06$   $\mu\text{M}/\text{mg}$  de fígado;  $p < 0,01$ ; Figura 6B) e acúmulo de gordura intrahepática ( $1,40 \pm 0,24$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 6B). A substituição da dieta de cafeteria (CAF/CAF) pela dieta controle (CAF/CTR) foi capaz de reduzir as injúrias hepáticas ( $1,66 \pm 0,40$  U/L;  $p < 0,01$ ; Figura 6B), danos oxidativos ( $0,17 \pm 0,02$   $\mu\text{M}/\text{mg}$  de fígado;  $p < 0,0001$ ; Figura 6B) e o acúmulo de gordura intrahepática ( $0,83 \pm 0,30$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 6B). Por fim, a introdução de dieta DC para os animais previamente alimentados com dieta CAF (CAF/DC) quando comparados ao grupo CAF/CAF foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica ( $0,52 \pm 0,06$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 6B) sem diminuir os danos hepáticos (Figura 6B) e a esteatose (Figura 6B).

O fígado é a maior glândula endócrina do corpo humano, e atua no metabolismo de macro- e micronutrientes (carboidratos, lipídeos, proteínas e vitaminas), drogas e hormônios (TENNANT, 1997).



**FIGURA 6. Avaliação de danos hepáticos.** **A**, peso do fígado (g/10g); **B**, atividade da enzima alanina aminotransferase (U/L); **C**, níveis hepáticos de malondialdeído – MDA ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de fígado) avaliado nos grupos experimentais que receberam somente dieta controle (CTR/CTR), dieta controle seguida de dieta cetogênica (CTR/DC), somente dieta de cafeteria (CAF/CAF), dieta de cafeteria seguida de dieta controle (CAF/CTR) e dieta de cafeteria seguida de dieta cetogênica (CAF/DC). As barras representam média  $\pm$  EPM (One-Way ANOVA - Newman Keuls). As diferenças foram consideradas quando  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo CTR/CTR, <sup>b</sup> ao grupo CTR/DC, <sup>c</sup> ao grupo CAF/CAF e <sup>d</sup> ao grupo CAF/CTR.

Situações de desequilíbrio energético resultam em uma maior atividade hepática e conseqüentemente em acúmulo adiposo no órgão, conhecido como esteatose. A esteatose é a manifestação inicial da doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), um conjunto de manifestações hepáticas associadas ao acúmulo adiposo no órgão independente do consumo de álcool e que pode progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular (BYRNE; TARGHER, 2015). Como a perda de peso é importante para o controle da DHGNA, o uso de DC

tem aumentado como estratégia terapêutica para a DHGNA (THOMA; DAY; TRENELL, 2012).

Em nossos resultados, mesmo com o aumento dos estoques de gordura intra-hepáticos não foram observadas alterações da massa hepática entre os diferentes grupos. A variação dos resultados relacionados ao peso desse órgão é muito comum entre estudos que avaliam diferentes dietas, com alguns demonstrando aumento do peso relativo hepático (MAEDA JÚNIOR, A. S. et al., 2018) e outros com ausência de alteração (SCHUGAR et al., 2013).

Pela comodidade e moderada especificidade, a avaliação da atividade da enzima ALT tornou-se um marcador clínico padrão de lesão hepática. Em situações de danos aos hepatócitos observa-se uma liberação passiva dessas enzimas intracelulares para o plasma (SMITH et al., 2020). O aumento da atividade da ALT está relacionado a uma gama de doenças como a hepatite viral, esteatose hepática e atualmente tem sido relacionada não só à danos hepáticos, mas também a outras doenças metabólicas não hepáticas (GOESSLING et al., 2008; SOOKOIAN; PIROLA, 2015).

Assim como a massa hepática discutida anteriormente, as lesões em hepatócitos associados ao consumo de dieta DC também são variáveis. Alguns autores relatam ausência de alterações de atividade das transaminases (PAOLI; CENCI; GRIMALDI, 2011; BRUCI et al., 2020; MOORE et al., 2020) enquanto outros relatam aumento da atividade destas enzimas, de forma semelhante ao observado em nosso estudo. O aumento da atividade de ALT e AST foi observado nos estudos de GARBOW et al. (2011) e de ZHANG et al. (2018) após intervenção com DC isenta de CHO por períodos prolongados em camundongos C57BL/6 e ratos diabéticos, respectivamente.

Além da alteração da atividade de transaminases, a DHGNA também é caracterizada por um aumento do estresse oxidativo em hepatócitos. A hipótese mais aceita para o desenvolvimento/agravamento da DHGNA é a hipótese dos múltiplos *hits*, que descreve que alterações metabólicas (e.g. obesidade, dislipidemias, diabetes, etc.) favorecem a lipogênese *de novo*, o influxo de ácidos graxos livres e o acúmulo de triglicerídeos no interior do hepatócito levando ao desenvolvimento de esteatose, a manifestação inicial da DHGNA. A esteatose aumenta a suscetibilidade do fígado ao segundo *hit*, causado por estresse oxidativo, citocinas e adipocinas inflamatórias e disfunção mitocondrial, que

desencadeariam um processo inflamatório e evolução para uma esteatohepatite e fibrose (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016).

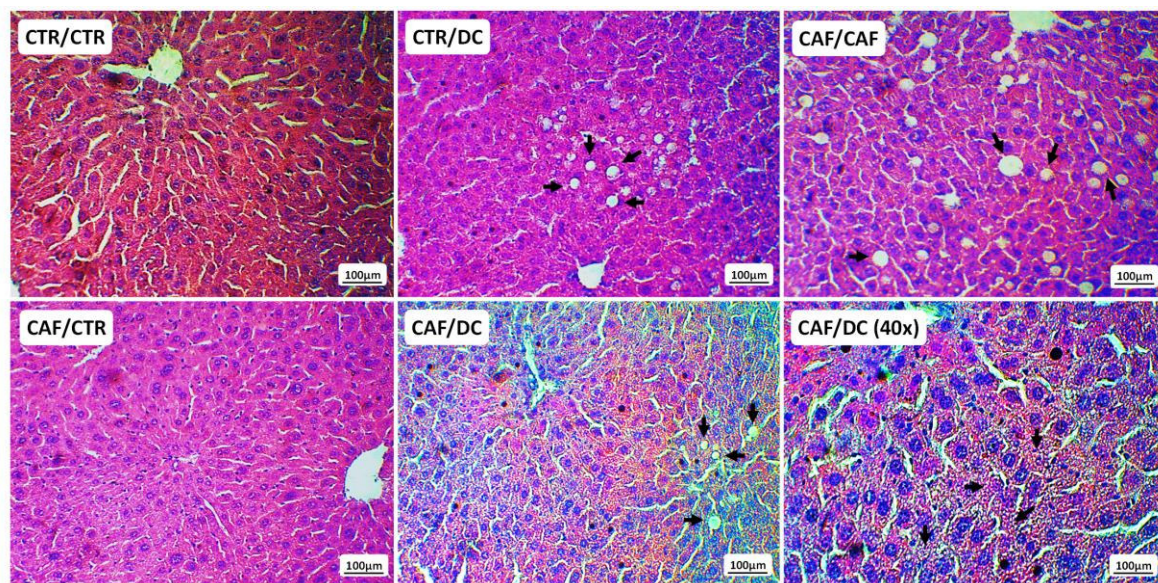
O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular considerado um dos principais contribuintes para diversas doenças incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (TSIKAS, 2017). Comumente, a avaliação do perfil redox é feita pela avaliação da atividade de enzimas antioxidantes (e.g. superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, etc.) e mensuração do grau de peroxidação lipídica causada pelo ataque de espécies reativas, gerando produtos indiretos de oxidação como o malondialdeído e 4-hidroxinonenal (MUSTAFA; ALFAQIH; AL-SHBOUL, 2018).

Apesar da indicação da dieta DC para controle de DHGNA, a literatura demonstra que a utilização desta dieta por períodos prolongados (acima de 7 semanas) pode levar a um desequilíbrio redox e consequente diminuição de defesa antioxidante (MOORE et al., 2020), carbonilação proteica hepática (HUANG et al., 2018) e peroxidação lipídica (MOORE et al., 2020; ZHANG et al., 2020; MU et al., 2022) que, em conjunto, levam à instauração de estresse oxidativo, tal como observado em nosso estudo.

Aliado a injúria celular e danos oxidativos, os hepatócitos de nossos animais alimentados com dieta de cafeteria e/ou cetogênica também apresentaram aumento de esteatose. Os grupos avaliados apresentaram esteatose do tipo macrovesicular quando comparados ao grupo CTR/CTR, com exceção do grupo CAF/DC que apresentou uma esteatose do tipo mista com presença de vacúolos macrovesiculares e predomínio de microvesiculares (Figura 7).

É bem estabelecido que a dieta de cafeteria ao oferecer uma sobrecarga nutricional, leva a uma série de alterações hepáticas que culminarão no desenvolvimento de DHGNA em roedores. O alto aporte calórico leva a severos danos hepáticos, que vão desde aumento dos níveis de glicogênio (MAEDA JÚNIOR et al., 2018), estresse oxidativo (DEL BAS et al., 2018; MEWES et al., 2019), esteatose (ZEENI et al., 2015; DEL BAS et al., 2018; MAŠEK et al., 2020), inflamação e *ballooning* (GASPARIN et al., 2018; MAŠEK et al., 2020), fibrose e apoptose (ZEENI et al., 2015; MAŠEK et al., 2020).

Por outro lado, a DC já foi referida como uma estratégia para controle de DHGNA e desordens hepáticas associadas em humanos (TENDLER et al., 2007; PÉREZ-GUISADO; MUÑOZ-SERRANO, 2011). Em roedores, mesmo em curto período de exposição, a DC foi capaz de reduzir a resistência hepática à insulina, a atividade de  $\gamma$ -glutamil transferase e fosfatase alcalina (sem alterar a atividade de ALT e AST) e mais de 30% do conteúdo de gordura intra-hepática (LUUKKONEN et al., 2020).



	CTR/CTR	CTR/DC	CAF/CAF	CAF/CTR	CAF/DC
<b>Esteatose</b>	0 ± 0	1,4 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,88 ± 1,25 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,3 <sup>ac</sup>	2 ± 0 <sup>ad</sup>
<b>Ballooning</b>	0 ± 0	0,20 ± 0,2	0,25 ± 0,25	0 ± 0	0,5 ± 0,5
<b>Inflamação</b>	0 ± 0	0,4 ± 0,24	0,25 ± 0,25	0 ± 0	0 ± 0
<b>Total</b>	0 ± 0	2 ± 0,31 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,3 <sup>bc</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>ad</sup>

**FIGURA 7. Histopatologia hepática.** Lâminas histológicas dos fígados (100µm, 20x e 40x) de camundongos que receberam somente dieta controle (CTR/CTR), dieta controle seguida de dieta cetogênica (CTR/DC), somente dieta de cafeteria (CAF/CAF), dieta de cafeteria seguida de dieta controle (CAF/CTR) e dieta de cafeteria seguida de dieta cetogênica (CAF/DC). Os valores representam média ± EPM (One-Way ANOVA - Newman Keuls). As diferenças foram consideradas quando  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> representa diferença em relação ao grupo CTR/CTR, <sup>b</sup> ao grupo CTR/DC, <sup>c</sup> ao grupo CAF/CAF e <sup>d</sup> ao grupo CAF/CTR.

Contudo, em nosso estudo observamos que a intervenção dietética com DC não foi capaz de reverter as alterações bioquímicas e histopatológicas nos fígados dos animais previamente alimentados com dieta CAF; levou ao quadro de esteatose mesmo em animais previamente alimentados com dieta controle; e, de maneira ainda mais drástica, alterou o perfil histológico dos animais CAF

de esteatose do tipo macrovesicular para microvesicular, que configura um pior prognóstico para evolução de esteatose para uma EHNA (KLEINER, D. E.; MAKHLOUF, 2016). Em concordância aos nossos achados, outros trabalhos evidenciaram o desenvolvimento de esteatose (ZHANG et al., 2020) e até fibrose em animais com alterações metabólicas prévias e alimentados com DC (ZHANG et al., 2018).

A dieta cetogênica parece estar intimamente ligada a patogênese da DHGNA por conta do seu alto teor de gordura e da capacidade dos ácidos graxos em desregular as vias lipogênicas hepáticas. Esta desregulação promove uma redução dos processos de  $\beta$ -oxidação e síntese de lipídeos, que se acumularão nos hepatócitos gerando esteatose ou serão exportados para a corrente sanguínea onde afetará tecidos extra-hepáticos (NEUSCHWANDER-TETRI, 2010; GEISLER; RENQUIST, 2017). De fato, as altas concentrações de  $\beta$ -hidroxibutirato, característica da dieta cetogênica, podem estar associadas ao aumento da produção de radicais livres, que levam a lesão hepatocelular, principalmente danos na mitocôndria, podendo levar a apoptose celular, resultante de altas concentrações de ácidos graxos livres (KIM, H.-J. et al., 2011).

## 7. CONCLUSÕES

Em nosso estudo demonstramos que a exposição de camundongos a uma dieta do tipo cafeteria induz um fenótipo obesogênico, marcado por aumento de peso corpóreo, obesidade central, dislipidemia, hiperglicemia, intolerância a glicose, e resistência à insulina. Ademais, a dieta CAF levou a alterações hepáticas nos animais, marcada por aumento da atividade de transaminases, estresse oxidativo e esteatose.

A administração de dieta cetogênica para animais previamente obesos pela dieta CAF não foi eficiente em alterar este perfil disfuncional, sendo capaz de controlar somente os níveis glicêmicos. E a administração de dieta DC para animais saudáveis levou ao desenvolvimento das mesmas disfunções, mesmo que em menor grau. Por outro lado, a substituição da dieta obesogênica por uma dieta padrão CTR foi eficiente em reverter todos estes parâmetros.

Dessa forma podemos concluir que a dieta cetogênica, com a composição dietética e período de nosso estudo, não deve ser indicada para redução de peso, pois instaura em saudáveis e agrava em obesos uma série de disfunções metabólicas e até DHGNA. Podemos inferir que a simples introdução de hábitos alimentares saudáveis se mostrou mais eficaz na reversão das desordens metabólicas provocadas por uma dieta obesogênica.



## REFERÊNCIAS

ACCURSO, A.; BERNSTEIN, R. K.; DAHLQVIST, A.; DRAZNIN, B.; FEINMAN, R. D.; FINE, E. J.; GLEED, A.; JACOBS, D. B.; LARSON, G.; LUSTIG, R. H. Dietary carbohydrate restriction in type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: time for a critical appraisal. *Nutr Metab (Lond)*, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2008.

ALBERTI, K. G.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, K. A.; FRUCHART, J.-C.; JAMES, W. P. T.; LORIA, C. M.; SMITH JR, S. C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009.

AOUICHAT, S.; CHAYAH, M.; BOUGUERRA-AOUICHAT, S.; AGIL, A. Time-restricted feeding improves body weight gain, lipid profiles, and atherogenic indices in cafeteria-diet-fed rats: role of browning of inguinal white adipose tissue. *Nutrients*, v. 12, n. 8, p. 2185, 2020.

APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*, v. 22, n. 7 Suppl, p. s176-185, 2016.

ARAFAT, A. M.; WEICKERT, M.; ADAMIDOU, A.; OTTO, B.; PERSCHEL, F.; SPRANGER, J.; MÖHLIG, M.; PFEIFFER, A. The impact of insulin-independent, glucagon-induced suppression of total ghrelin on satiety in obesity and type 1 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 98, n. 10, p. 4133-4142, 2013.

BADMAN, M. K.; KENNEDY, A. R.; ADAMS, A. C.; PISSIOS, P.; MARATOS-FLIER, E. A very low carbohydrate ketogenic diet improves glucose tolerance in ob/ob mice independently of weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 297, n. 5, p. E1197-1204, 2009.

BESSEICHE, A.; RIVELINE, J. P.; GAUTIER, J. F.; BRÉANT, B.; BLONDEAU, B. Metabolic roles of PGC-1 $\alpha$  and its implications for type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, v. 41, n. 5, p. 347-357, 2015.

BHARDWAJ, B.; O'KEEFE, E. L.; O'KEEFE, J. H. Death by Carbs: Added Sugars and Refined Carbohydrates Cause Diabetes and Cardiovascular Disease in Asian Indians. *Mo Med*, v. 113, n. 5, p. 395-400, 2016.

BOLLA, A. M.; CARETTO, A.; LAURENZI, A.; SCAVINI, M.; PIEMONTE, L. Low-carb and ketogenic diets in type 1 and type 2 diabetes. *Nutrients*, v. 11, n. 5, p. 962, 2019.

BORGHJID, S.; FEINMAN, R. D. Response of C57Bl/6 mice to a carbohydrate-free diet. *Nutr Metab (Lond)*, v. 9, n. 1, p. 69, 2012.

BRASIL. Vigitel Brasil 2020: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2020. Brasília: Ministério da Saúde, 2021

BROWNLOW, M. L.; BENNER, L.; D'AGOSTINO, D.; GORDON, M. N.; MORGAN, D. Ketogenic diet improves motor performance but not cognition in two mouse models of Alzheimer's pathology. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e75713, 2013.

BRUCI, A.; TUCCINARDI, D.; TOZZI, R.; BALENA, A.; SANTUCCI, S.; FRONTANI, R.; MARIANI, S.; BASCIANI, S.; SPERA, G.; GNESSI, L. Very low-calorie ketogenic diet: a safe and effective tool for weight loss in patients with obesity and mild kidney failure. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 333, 2020.

BURCELIN, R.; CRIVELLI, V.; DACOSTA, A.; ROY-TIRELLI, A.; THORENS, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 282, n. 4, p. E834-842, 2002.

BUYUKDERE, Y.; GULEC, A.; AKYOL, A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*, v. 7, n., p. e6656, 2019.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology*, v. 62, n. 1, p. S47-S64, 2015.

CASAS, R.; CASTRO-BARQUERO, S.; ESTRUCH, R.; SACANELLA, E. Nutrition and cardiovascular health. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 12, p. 3988, 2018.

CASTRO-BARQUERO, S.; RUIZ-LEÓN, A. M.; SIERRA-PÉREZ, M.; ESTRUCH, R.; CASAS, R. Dietary Strategies for Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. *Nutrients*, v. 12, n. 10, p., 2020.

CASTRO, H.; POMAR, C.; PICÓ, C.; SÁNCHEZ, J.; PALOU, A. Cafeteria diet overfeeding in young male rats impairs the adaptive response to fed/fasted conditions and increases adiposity independent of body weight. *International journal of obesity*, v. 39, n. 3, p. 430-437, 2015.

CERCATO, C.; FONSECA, F. Cardiovascular risk and obesity. *Diabetology & metabolic syndrome*, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2019.

CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; GARÓFALO, M. A.; NAVEGANTES, L. C.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Increased glyceride-glycerol synthesis in liver and brown adipose tissue of rat: in-vivo contribution of glycolysis and glyceroneogenesis. *Lipids*, v. 47, n. 8, p. 773-780, 2012.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*, v. 92, n., p. 6-10, 2019.

COLDITZ, G. A. Economic costs of obesity. *Am J Clin Nutr*, v. 55, n. 2 Suppl, p. 503s-507s, 1992.

COOPER, M. A.; MENTA, B. W.; PEREZ-SANCHEZ, C.; JACK, M. M.; KHAN, Z. W.; RYALS, J. M.; WINTER, M.; WRIGHT, D. E. A ketogenic diet reduces metabolic syndrome-induced allodynia and promotes peripheral nerve growth in mice. *Exp Neurol*, v. 306, n., p. 149-157, 2018.

DEL BAS, J.; GUIRRO, M.; BOQUÉ, N.; CERETO, A.; RAS, R.; CRESCENTI, A.; CAIMARI, A.; CANELA, N.; AROLA, L. Alterations in gut microbiota associated with a cafeteria diet and the physiological consequences in the host. *International journal of obesity*, v. 42, n. 4, p. 746-754, 2018.

DOURIS, N.; DESAI, B. N.; FISHER, F. M.; CISU, T.; FOWLER, A. J.; ZAREBIDAKI, E.; NGUYEN, N. L. T.; MORGAN, D. A.; BARTNESS, T. J.; RAHMOUNI, K.; FLIER, J. S.; MARATOS-FLIER, E. Beta-adrenergic receptors are critical for weight loss but not for other metabolic adaptations to the consumption of a ketogenic diet in male mice. *Mol Metab*, v. 6, n. 8, p. 854-862, 2017.

EASL-EASD-EASO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, v. 64, n. 6, p. 1388-1402, 2016.

ELLENBROEK, J. H.; VAN DIJCK, L.; TÖNS, H. A.; RABELINK, T. J.; CARLOTTI, F.; BALLIEUX, B. E.; DE KONING, E. J. Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced  $\beta$ - and  $\alpha$ -cell mass but no weight loss in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v., n., p., 2014.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, v. 960, n., p. 1-17, 2017.

FLISTER, K. F. T.; PINTO, B. A. S.; FRANÇA, L. M.; COELHO, C. F. F.; DOS SANTOS, P. C.; VALE, C. C.; KAJIHARA, D.; DEBBAS, V.; LAURINDO, F. R. M.; PAES, A. M. A. Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. *J Nutr Biochem*, v. 62, n., p. 155-166, 2018.

FRANCQUE, S.; WONG, V. W.-S. NAFLD in lean individuals: not a benign disease. *Gut*, v. 71, n. 2, p. 234-236, 2022.

FREEMAN, J. M.; VINING, E. P.; KOSSOFF, E. H.; PYZIK, P. L.; YE, X.; GOODMAN, S. N. A blinded, crossover study of the efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsia*, v. 50, n. 2, p. 322-325, 2009.

FRUH, S. M. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*, v. 29, n. S1, p. S3-s14, 2017.

GARBOW, J. R.; DOHERTY, J. M.; SCHUGAR, R. C.; TRAVERS, S.; WEBER, M. L.; WENTZ, A. E.; EZENWAJIAKU, N.; COTTER, D. G.; BRUNT, E. M.; CRAWFORD, P. A. Hepatic steatosis, inflammation, and ER stress in mice maintained long term on a very low-carbohydrate ketogenic diet. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 300, n. 6, p. G956-G967, 2011.

GASPARIN, F. R. S.; CARREÑO, F. O.; MEWES, J. M.; GILGLIONI, E. H.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; NATALI, M. R. M.; UTSUNOMIYA, K. S.; CONSTANTIN, R. P.; OUCHIDA, A. T.; CURTI, C.; GAEMERS, I. C.; ELFERINK, R.; CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, v. 1864, n. 7, p. 2495-2509, 2018.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *Journal of Endocrinology*, v. 234, n. 1, p. R1-R21, 2017.

GOESSLING, W.; MASSARO, J. M.; VASAN, R. S.; D'AGOSTINO SR, R. B.; ELLISON, R. C.; FOX, C. S. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology*, v. 135, n. 6, p. 1935-1944. e1931, 2008.

GRANDL, G.; STRAUB, L.; RUDIGIER, C.; ARNOLD, M.; WUEEST, S.; KONRAD, D.; WOLFRUM, C. Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet. *The Journal of physiology*, v. 596, n. 19, p. 4597-4609, 2018.

GREGG, E. W.; SHAW, J. E. Global health effects of overweight and obesity: secondary title: *Mass Medical Soc*, 2017.

HALL, K. D.; CHEN, K. Y.; GUO, J.; LAM, Y. Y.; LEIBEL, R. L.; MAYER, L. E.; REITMAN, M. L.; ROSENBAUM, M.; SMITH, S. R.; WALSH, B. T.; RAVUSSIN, E. Energy expenditure and body composition changes after an isocaloric ketogenic diet in overweight and obese men. *Am J Clin Nutr*, v. 104, n. 2, p. 324-333, 2016.

HAZARIKA, A.; KALITA, H.; BORUAH, D. C.; KALITA, M. C.; DEVI, R. Pathophysiology of metabolic syndrome: The onset of natural recovery on withdrawal of a high-carbohydrate, high-fat diet. *Nutrition*, v. 32, n. 10, p. 1081-1091, 2016.

HER, T. K.; LAGAKOS, W. S.; BROWN, M. R.; LEBRASSEUR, N. K.; RAKSHIT, K.; MATVEYENKO, A. V. Dietary carbohydrates modulate metabolic and  $\beta$ -cell adaptation to high-fat diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 318, n. 6, p. E856-e865, 2020.

HOLLAND, A. M.; KEPHART, W. C.; MUMFORD, P. W.; MOBLEY, C. B.; LOWERY, R. P.; SHAKE, J. J.; PATEL, R. K.; HEALY, J. C.; MCCULLOUGH, D. J.; KLUSS, H. A. Effects of a ketogenic diet on adipose tissue, liver, and serum biomarkers in sedentary rats and rats that exercised via resisted voluntary wheel running. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v., n., p., 2016.

HUANG; MA, S.; TOMINAGA, T.; SUZUKI, K.; LIU, C. An 8-Week, Low carbohydrate, high fat, ketogenic diet enhanced exhaustive exercise capacity in mice Part 2: Effect on fatigue recovery, post-exercise biomarkers and anti-oxidation capacity. *Nutrients*, v. 10, n. 10, p. 1339, 2018.

HUANG, J.; LI, Y. Q.; WU, C. H.; ZHANG, Y. L.; ZHAO, S. T.; CHEN, Y. J.; DENG, Y. H.; XUAN, A.; SUN, X. D. The effect of ketogenic diet on behaviors and synaptic functions of naive mice. *Brain and Behavior*, v. 9, n. 4, p. e01246, 2019.

JASTREBOFF, A. M.; KOTZ, C. M.; KAHAN, S.; KELLY, A. S.; HEYMSFIELD, S. B. Obesity as a disease: the obesity society 2018 position statement. *Obesity*, v. 27, n. 1, p. 7-9, 2019.

JENNISON, E.; PATEL, J.; SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J*, v. 95, n. 1124, p. 314-322, 2019.

JORNAYVAZ, F. R.; JURCZAK, M. J.; LEE, H. Y.; BIRKENFELD, A. L.; FREDERICK, D. W.; ZHANG, D.; ZHANG, X. M.; SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 299, n. 5, p. E808-815, 2010.

KATHER, H.; WIELAND, E.; SCHEURER, A.; VOGEL, G.; WILDENBERG, U.; JOOST, C. Influences of variation in total energy intake and dietary composition on regulation of fat cell lipolysis in ideal-weight subjects. *J Clin Invest*, v. 80, n. 2, p. 566-572, 1987.

KENNEDY, A. R.; PISSIOS, P.; OTU, H.; XUE, B.; ASAKURA, K.; FURUKAWA, N.; MARINO, F. E.; LIU, F.-F.; KAHN, B. B.; LIBERMANN, T. A. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 292, n. 6, p. E1724-E1739, 2007.

KIM, C. H.; YOUNOSSI, Z. M. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*, v. 75, n. 10, p. 721-728, 2008.

KIM, H.-J.; KIM, J. H.; NOH, S.; HUR, H. J.; SUNG, M. J.; HWANG, J.-T.; PARK, J. H.; YANG, H. J.; KIM, M.-S.; KWON, D. Y. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 2, p. 722-731, 2011.

KLEINER; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KLEINER, D. E.; MAKHLOUF, H. R. Histology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults and children. *Clinics in liver disease*, v. 20, n. 2, p. 293-312, 2016.

KLEINER, D. E. Histopathology, grading and staging of nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, v. 64, n. 1, p. 28-38, 2017.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The therapeutic potential of ketogenic diet throughout life: focus on metabolic, neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Reviews on Biomarker Studies in Aging and Anti-Aging Research*, v., n., p. 77-101, 2019.

LEITNER, D. R.; FRÜHBECK, G.; YUMUK, V.; SCHINDLER, K.; MICIC, D.; WOODWARD, E.; TOPLAK, H. Obesity and type 2 diabetes: two diseases with a need for combined treatment strategies-EASO can lead the way. *Obesity facts*, v. 10, n. 5, p. 483-492, 2017.

LONGO, R.; PERI, C.; CRICRÌ, D.; COPPI, L.; CARUSO, D.; MITRO, N.; DE FABIANI, E.; CRESTANI, M. Ketogenic Diet: A New Light Shining on Old but Gold Biochemistry. *Nutrients*, v. 11, n. 10, p., 2019.

LUUKKONEN, P. K.; DUFOUR, S.; LYU, K.; ZHANG, X.-M.; HAKKARAINEN, A.; LEHTIMÄKI, T. E.; CLINE, G. W.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I.; YKI-JÄRVINEN, H. Effect of a ketogenic diet on hepatic steatosis and hepatic mitochondrial metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 13, p. 7347-7354, 2020.

MACEDO, I. C.; FREITAS, J. S.; TORRES, I. L. The influence of palatable diets in reward system activation: a mini review. *Advances in pharmacological sciences*, v. 2016, n., p., 2016.

MAEDA JÚNIOR; CONSTANTIN, J.; UTSUNOMIYA, K. S.; GILGLIONI, E. H.; GASPARIN, F. R. S.; CARREÑO, F. O.; DE MORAES, S. M. F.; ROCHA, M.; NATALI, M. R. M.; GHIZONI, C. V. C.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CONSTANTIN, R. P. Cafeteria Diet Feeding in Young Rats Leads to Hepatic Steatosis and Increased Gluconeogenesis under Fatty Acids and Glucagon Influence. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p., 2018.

MAEDA JÚNIOR, A. S.; CONSTANTIN, J.; UTSUNOMIYA, K. S.; GILGLIONI, E. H.; GASPARIN, F. R. S.; CARREÑO, F. O.; DE MORAES, S. M. F.; ROCHA, M.; NATALI, M. R. M.; GHIZONI, C. V. D. C. Cafeteria diet feeding in young rats leads to hepatic steatosis and increased gluconeogenesis under fatty acids and glucagon influence. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1571, 2018.

MANCO, M. Insulin resistance and NAFLD: A dangerous liaison beyond the genetics. *Children*, v. 4, n. 8, p. 74, 2017.

MANTOVANI, A.; DALBENI, A. Recent Developments in NAFLD: secondary title: MDPI, 2022. 23, 2882 p.

MARTÍN-GONZÁLEZ, M. Z.; PALACIOS-JORDAN, H.; IBARS, M.; ARDID-RUIZ, A.; GIBERT-RAMOS, A.; RODRÍGUEZ, M. A.; SUÁREZ, M.; MUGUERZA, B.; ARAGONÈS, G. A novel dietary multifunctional ingredient reduces body weight and improves leptin sensitivity in cafeteria diet-fed rats. *Journal of Functional Foods*, v. 73, n., p. 104141, 2020.

MAŠEK, T.; BARIŠIĆ, J.; MICEK, V.; STARČEVIĆ, K. Cafeteria Diet and High-Fructose Rodent Models of NAFLD Differ in the Metabolism of Important PUFA and Palmitoleic Acid without Additional Influence of Sex. *Nutrients*, v. 12, n. 11, p., 2020.

MASOOD, W.; ANNAMARAJU, P.; UPPALURI, K. R. Ketogenic Diet. In: (Ed.). *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., 2021,*

MBALLA, D.; YADANG, F. S. A.; TCHAMGOUE, A. D.; MBA, J. R.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; E, M. B.; A, T. T.; DJOMENI DZEUFLET, D. P.; AGBOR, G. A. Cafeteria Diet-Induced Metabolic and Cardiovascular Changes in Rats: The Role of Piper nigrum Leaf Extract. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2021, n., p. 5585650, 2021.

MENG, Y.; LI, S.; KHAN, J.; DAI, Z.; LI, C.; HU, X.; SHEN, Q.; XUE, Y. Sugar- and Artificially Sweetened Beverages Consumption Linked to Type 2 Diabetes, Cardiovascular Diseases, and All-Cause Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Nutrients*, v. 13, n. 8, p. 2636, 2021.

MEWES, J.; RODRIGUES SILVA GASPARIN, F.; YOSHIDA, T.; AMÂNCIO DANIEL DA SILVA, M.; RAQUEL MARÇAL NATALI, M.; FRANCISCO VEIGA BIZERRA, P.; SAYURI UTSUNOMIYA, K.; HIDEO GILGLIONI, E.; SHIGUEAKI MITO, M.; CRISTIANE MANTOVANELLI, G.; THAIS LIMA DE SOUZA, B.; MAKIYAMA KLOSOWSKI, E.; LUIZA ISHII-IWAMOTO, E.; CONSTANTIN, J.; POLIMENI CONSTANTIN, R. The Role of Mitochondria in Sex-Dependent Differences in Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Response to Cafeteria Diet-Induced Obesity in Mice. *Nutrients*, v. 11, n. 7, p., 2019.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol*, v. 20, n. 28, p. 9330-9337, 2014.

MONTAGUE, C. T.; O'RAHILLY, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*, v. 49, n. 6, p. 883-888, 2000.

MOORE, M. P.; CUNNINGHAM, R. P.; KELTY, T. J.; BOCCARDI, L. R.; NGUYEN, N. Y.; BOOTH, F. W.; RECTOR, R. S. Ketogenic diet in combination with voluntary exercise impacts markers of hepatic metabolism and oxidative stress in male and female Wistar rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 45, n. 1, p. 35-44, 2020.

MORAIS, J.; RODRIGUES SILVA GASPARIN, F.; YOSHIDA, T.; AMÂNCIO DANIEL DA SILVA, M.; RAQUEL MARÇAL NATALI, M.; FRANCISCO VEIGA BIZERRA, P.; SAYURI UTSUNOMIYA, K.; HIDEO GILGLIONI, E.; SHIGUEAKI MITO, M.; CRISTIANE MANTOVANELLI, G. The role of mitochondria in sex-dependent differences in hepatic steatosis and oxidative stress in response to cafeteria diet-induced obesity in mice. *Nutrients*, v. 11, n. 7, p. 1618, 2019.

MU, C.; NIKPOOR, N.; TOMPKINS, T. A.; RHO, J. M.; SCANTLEBURY, M. H.; SHEARER, J. Probiotics counteract hepatic steatosis caused by ketogenic diet and upregulate AMPK signaling in a model of infantile epilepsy. *EBioMedicine*, v., n., p. 103838, 2022.

MUSTAFA, A. G.; ALFAQIH, M. A.; AL-SHBOUL, O. The 4-hydroxynonenal mediated oxidative damage of blood proteins and lipids involves secondary lipid peroxidation reactions. *Exp Ther Med*, v. 16, n. 3, p. 2132-2137, 2018.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology*, v. 52, n. 2, p. 774-788, 2010.

NEWMAN, J. C.; COVARRUBIAS, A. J.; ZHAO, M.; YU, X.; GUT, P.; NG, C. P.; HUANG, Y.; HALDAR, S.; VERDIN, E. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab*, v. 26, n. 3, p. 547-557.e548, 2017.

OLADEJO, A. Overview of the metabolic syndrome; an emerging pandemic of public health significance. *Annals of ibadan postgraduate medicine*, v. 9, n. 2, p. 78-82, 2011.

PAOLI, A.; CENCI, L.; GRIMALDI, K. A. Effect of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts and low carbohydrates/high-protein meals on weight, cardiovascular risk factors, body composition and diet compliance in Italian council employees. *Nutrition journal*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2011.

PAOLI, A.; MANCIN, L.; BIANCO, A.; THOMAS, E.; MOTA, J. F.; PICCINI, F. Ketogenic diet and microbiota: friends or enemies? *Genes*, v. 10, n. 7, p. 534, 2019.

PARK, G.-M.; CHO, Y.-R.; WON, K.-B.; YANG, Y. J.; PARK, S.; ANN, S. H.; KIM, Y.-G.; PARK, E. J.; KIM, S.-J.; LEE, S.-G. Triglyceride glucose index is a useful



marker for predicting subclinical coronary artery disease in the absence of traditional risk factors. *Lipids in health and disease*, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2020.

PÉREZ-GUISADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A. The effect of the Spanish Ketogenic Mediterranean Diet on nonalcoholic fatty liver disease: a pilot study. *J Med Food*, v. 14, n. 7-8, p. 677-680, 2011.

RANA, S.; ALI, S.; WANI, H. A.; MUSHTAQ, Q. D.; SHARMA, S.; REHMAN, M. U. Metabolic syndrome and underlying genetic determinants-A systematic review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, v., n., p. 1-10, 2022.

REYNÉS, B.; GARCÍA-RUIZ, E.; DÍAZ-RÚA, R.; PALOU, A.; OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food research international*, v. 64, n., p. 839-848, 2014.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama*, v. 313, n. 22, p. 2263-2273, 2015.

ROSENBAUM, M.; HALL, K. D.; GUO, J.; RAVUSSIN, E.; MAYER, L. S.; REITMAN, M. L.; SMITH, S. R.; WALSH, B. T.; LEIBEL, R. L. Glucose and lipid homeostasis and inflammation in humans following an isocaloric ketogenic diet. *Obesity*, v. 27, n. 6, p. 971-981, 2019.

RUISSEN, M. M.; MAK, A. L.; BEUERS, U.; TUSHUIZEN, M. E.; HOLLEBOOM, A. G. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Non-alcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach towards a cardiometabolic liver disease. *European Journal of Endocrinology*, v. 183, n. 3, p. R57-R73, 2020.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*, v. 127, n. 1, p. 1-4, 2017.

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SASLOW, L. R.; DAUBENMIER, J. J.; MOSKOWITZ, J. T.; KIM, S.; MURPHY, E. J.; PHINNEY, S. D.; PLOUTZ-SNYDER, R.; GOLDMAN, V.; COX, R. M.; MASON, A. E. Twelve-month outcomes of a randomized trial of a moderate-carbohydrate versus very low-carbohydrate diet in overweight adults with type 2 diabetes mellitus or prediabetes. *Nutrition & diabetes*, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2017.

SAXTON, S. N.; CLARK, B. J.; WITHERS, S. B.; ERINGA, E. C.; HEAGERTY, A. M. Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue. *Physiol Rev*, v. 99, n. 4, p. 1701-1763, 2019.

SCHUGAR, R. C.; HUANG, X.; MOLL, A. R.; BRUNT, E. M.; CRAWFORD, P. A. Role of choline deficiency in the Fatty liver phenotype of mice fed a low protein, very low carbohydrate ketogenic diet. *PLoS One*, v. 8, n. 8, p. e74806, 2013.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SEIDELMANN, S. B.; CLAGGETT, B.; CHENG, S.; HENGLIN, M.; SHAH, A.; STEFFEN, L. M.; FOLSOM, A. R.; RIMM, E. B.; WILLETT, W. C.; SOLOMON, S. D. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *Lancet Public Health*, v. 3, n. 9, p. e419-e428, 2018.

SEZER, H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. In: (Ed.). *Obesity and Lipotoxicity*: Springer, 2017, p.277-304.

SHERLING, D. H.; PERUMAREDDI, P.; HENNEKENS, C. H. Metabolic syndrome: clinical and policy implications of the new silent killer. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, v. 22, n. 4, p. 365-367, 2017.

SMITH, A. K.; ROPELLA, G. E.; MCGILL, M. R.; KRISHNAN, P.; DUTTA, L.; KENNEDY, R. C.; JAESCHKE, H.; HUNT, C. A. Contrasting model mechanisms of alanine aminotransferase (ALT) release from damaged and necrotic hepatocytes as an example of general biomarker mechanisms. *PLoS computational biology*, v. 16, n. 6, p. e1007622, 2020.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 21, n. 3, p. 711, 2015.

STRINGHINI, M. L. F.; SILVA, J. M. C.; OLIVEIRA, F. G. D. Vantagens e desvantagens da dieta Atkins no tratamento da obesidade. *Salusvita*, v. 26, n. 2, p. 153-164, 2007.

SUMITHRAN, P.; PRENDERGAST, L. A.; DELBRIDGE, E.; PURCELL, K.; SHULKES, A.; KRIKETOS, A.; PROIETTO, J. Ketosis and appetite-mediating nutrients and hormones after weight loss. *European journal of clinical nutrition*, v. 67, n. 7, p. 759-764, 2013.

TAGLIABUE, A.; BERTOLI, S.; TRENTANI, C.; BORRELLI, P.; VEGGIOTTI, P. Effects of the ketogenic diet on nutritional status, resting energy expenditure, and substrate oxidation in patients with medically refractory epilepsy: a 6-month prospective observational study. *Clin Nutr*, v. 31, n. 2, p. 246-249, 2012.

TAYLOR, M. K.; SULLIVAN, D. K.; MAHNKEN, J. D.; BURNS, J. M.; SWERDLOW, R. H. Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, v. 4, n., p. 28-36, 2018.

TENDLER, D.; LIN, S.; YANCY, W. S.; MAVROPOULOS, J.; SYLVESTRE, P.; ROCKEY, D. C.; WESTMAN, E. C. The Effect of a Low-Carbohydrate, Ketogenic

Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pilot Study. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 52, n. 2, p. 589-593, 2007.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*: Elsevier, 1997, p.327-352.

THOMA, C.; DAY, C. P.; TRENELL, M. I. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *Journal of hepatology*, v. 56, n. 1, p. 255-266, 2012.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TIMLIN, D.; MCCORMACK, J. M.; KERR, M.; KEAVER, L.; SIMPSON, E. E. A. Are dietary interventions with a behaviour change theoretical framework effective in changing dietary patterns? A systematic review. *BMC Public Health*, v. 20, n. 1, p. 1857, 2020.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, v. 524, n., p. 13-30, 2017.

VANZELA, E. C.; RIBEIRO, R. A.; DE OLIVEIRA, C. A.; RODRIGUES, F. B.; BONFLEUR, M. L.; CARNEIRO, E. M.; SOUZA, K. L.; BOSCHERO, A. C. Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 298, n. 2, p. R320-328, 2010.

VEECH, R. L. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, v. 70, n. 3, p. 309-319, 2004.

VILLARROYA, F.; CEREIJO, R.; GAVALDÀ-NAVARRO, A.; VILLARROYA, J.; GIRALT, M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 284, n. 5, p. 492-504, 2018.

WALTON, C. M.; PERRY, K.; HART, R. H.; BERRY, S. L.; BIKMAN, B. T. Improvement in glycemic and lipid profiles in type 2 diabetics with a 90-day ketogenic diet. *Journal of diabetes research*, v. 2019, n., p., 2019.

WANG, Y.-D.; WU, L.-L.; QI, X.-Y.; WANG, Y.-Y.; LIAO, Z.-Z.; LIU, J.-H.; XIAO, X.-H. New insight of obesity-associated NAFLD: Dysregulated "crosstalk" between multi-organ and the liver? *Genes & Diseases*, v., n., p., 2022.

WASTERLAIN, C. G.; THOMPSON, K. W.; SUCHOMELOVA, L.; NIQUET, J. Brain energy metabolism during experimental neonatal seizures. *Neurochem Res*, v. 35, n. 12, p. 2193-2198, 2010.

WATANABE, M.; TOZZI, R.; RISI, R.; TUCCINARDI, D.; MARIANI, S.; BASCIANI, S.; SPERA, G.; LUBRANO, C.; GNESSI, L. Beneficial effects of the ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of the literature. *Obesity Reviews*, v. 21, n. 8, p. e13024, 2020.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZEENI, N.; DAGHER-HAMALIAN, C.; DIMASSI, H.; FAOUR, W. H. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflammation Research*, v. 64, n. 7, p. 501-512, 2015.

ZHANG; XU, L.; XIA, J.; WANG, D.; QIAN, M.; DING, S. Treatment of diabetic mice with a combination of ketogenic diet and aerobic exercise via modulations of PPARs gene programs. *PPAR research*, v. 2018, n., p., 2018.

ZHANG; SHEN, F.; SHEN, W.; XIA, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.; SUN, Y.; QIAN, M.; DING, S. High-intensity interval training attenuates ketogenic diet-induced liver fibrosis in type 2 diabetic mice by ameliorating TGF- $\beta$ 1/Smad signaling. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, v. 13, n., p. 4209, 2020.

ZHANG, X.; QIN, J.; ZHAO, Y.; SHI, J.; LAN, R.; GAN, Y.; REN, H.; ZHU, B.; QIAN, M.; DU, B. Long-term ketogenic diet contributes to glycemic control but promotes lipid accumulation and hepatic steatosis in type 2 diabetic mice. *Nutrition research*, v. 36, n. 4, p. 349-358, 2016.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.; SHAW, J. International Diabetes Federation: the IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *Diabetes voice*, v. 50, n., p. 31-33, 2005.

ZOU, Y.; FINEBERG, S.; PEARLMAN, A.; FEINMAN, R. D.; FINE, E. J. The effect of a ketogenic diet and synergy with rapamycin in a mouse model of breast cancer. *PLoS One*, v. 15, n. 12, p. e0233662, 2020.

## ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA**

**CIAEP: 01.0341.2014**



Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS METABÓLICOS NO PÂNCREAS ENDOCRINO DE ANIMAIS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA CETOGÊNICA**", Processo 23115.038755/2018-22, sob a responsabilidade de **ANA PAULA GAMEIRO CAPPELLI**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	( ) ENSINO (X) PESQUISA ( ) EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/04/2019 à 31/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos/Swiss/ <i>Mus musculus</i>
Nº de animais	200
Peso/Idade	13-20g/21 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMA

*Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho*  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA