

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

**VANESSA CRISTINA DE SOUZA MELO**

**EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA PELA DIETA PADRÃO  
SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E ESTEATOSE HEPÁTICA EM  
CAMUNDONGOS**

CASCAVEL-PR

(Jan/2024)

**VANESSA CRISTINA DE SOUZA MELO**

**EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA PELA DIETA PADRÃO  
SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E ESTEATOSE HEPÁTICA EM  
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia

ORIENTADOR: Profa. Dra. Sandra L. Balbo

COORIENTADOR: Prof. Dr. Jean F. Vettorazzi

CASCADEL-PR

(Jan/2024)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

de Souza Melo, Vanessa Cristina

Efeitos da substituição da dieta hiperlipídica pela dieta padrão sobre a homeostase glicêmica e esteatose hepática em camundongos / Vanessa Cristina de Souza Melo; orientadora Sandra Lucinei Balbo; coorientadora Jean Franciesco Vettorazzi. -- Cascavel, 2024.

61 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2024.

1. Obesidade. 2. Dietoterapia. 3. Dieta Hiperlipídica. 4. Esteatose Hepática. I. Lucinei Balbo, Sandra, orient. II. Vettorazzi, Jean Franciesco, coorient. III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Reitoria

CNPJ 78.680.337/0001-84

Rua Universitária, 1619, Jardim Universitário

Tel.: (45) 3220-3000 - Fax: (45) 3225-4590 - www.unioeste.br

CEP: 85819-110 - Cx. P.: 701

Cascavel - PARANÁ



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

## **VANESSA CRISTINA DE SOUZA MELO**

Efeitos da substituição da dieta hiperlipídica pela dieta padrão sobre a homeostase glicêmica e esteatose hepática em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde, linha de pesquisa Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Sandra Lucinei Balbo

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Maria Lucia Bonfleur

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Joseane Morari Ricciardi de Aguiar

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Cascavel, 30 de janeiro de 2024

## AGRADECIMENTOS

Essa parece ser a parte mais fácil do trabalho para escrever, contudo ela desperta tantos sentimentos e lembranças que fica difícil colocar em palavras toda a gratidão que tenho pelas pessoas que cruzaram meu caminho nesses quase dois anos de pesquisa.

Lembro como se fosse ontem eu entrando na sala de aula para a entrevista do processo seletivo e uma “certa” professora fazendo a maioria das perguntas. Mal sabia eu que ela seria a minha orientadora, a pessoa que acreditou no meu potencial sem nem ao menos me conhecer. Profa. Dra. Sandra Balbo, muito obrigada por tudo! Por todo apoio e paciência mesmo quando as coisas não ocorriam da maneira como esperávamos, por entender o meu retorno ao estado de SP e por me incentivar a prestar o doutorado na UNICAMP. Há três anos eu jamais imaginaria estar onde estou.

Dos dois anos de pesquisa, passei boa parte deles me acostumando/aprendendo as técnicas de laboratório e uma pessoa foi fundamental para me ajudar nessa rotina, meu co-orientador, Prof. Dr. Jean Vettorazzi. Gratidão! Muito obrigada pela calma de me explicar cada detalhe do WB e pelas considerações precisas na elaboração do artigo.

Uma coisa que aprendi com a vida acadêmica é o valor da colaboração, de que sozinho não se chega a lugar nenhum e, por isso, não posso deixar de agradecer meus colegas de laboratório, em especial os que eu tive mais contato e que por muitas vezes estiveram dispostos a me ajudar: Antônio, Jaque, Bruna, Amanda e Carol.

E como esquecer daqueles que dividiam comigo todo o trabalho braçal? Muito obrigadas aos alunos de PIBIC: Júlia Couto, Júlia Martins, Matheus e Izadora. Aprendemos muitas coisas juntos e torço para o sucesso na carreira de vocês.

Também quero agradecer a todos os professores do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biociências e Saúde da UNIOESTE pelos ensinamentos. Hoje tenho certeza de que saio com uma cabeça muito diferente daquela em que iniciei minha jornada. Em especial, gostaria de agradecer às professoras Dra. Maria Lúcia Bonfleur e Dra. Sabrina Grassioli que muito contribuíram para essa pesquisa, tanto na coleta de dados como colaborando na banca da qualificação.

Aos demais alunos do Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Biociências e Saúde da UNIOESTE muito obrigada pela parceria nas aulas. É muito bom ver a evolução de todos durante esse processo de amadurecimento profissional.

Um agradecimento também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E por fim, mas nem por isso menos importante, não posso deixar de agradecer minha família por todo apoio e compreensão nesse período.

Quero agradecer meus pais, Nelson e Edna Melo, por sempre terem se desdobrado e me possibilitado as melhores oportunidades de estudo. E por se fazerem presentes mesmo estando fisicamente longe.

Em especial, gostaria de agradecer meu marido, Mauricio Tiritilli. Com certeza a pessoa que mais me incentivou a buscar a carreira acadêmica. Tenho convicção de que sem ele, hoje eu não estaria escrevendo essa página. Má, muito obrigada por dar esse “empurrãozinho” e fazer eu acreditar em mim mesma.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

**Martin Luther King**

## RESUMO

MELO, V.C.S. **Efeitos da substituição da dieta hiperlipídica pela dieta padrão sobre a homeostase glicêmica e esteatose hepática em camundongos.** 63 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2024

O consumo de alimentos ultraprocessados, ricos em gordura, têm contribuído para o aumento mundial da obesidade e de outros distúrbios metabólicos decorrentes do excesso de tecido adiposo, entre eles a Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica. Prática de exercícios físicos e reeducação alimentar constituem o tratamento de primeira linha para o emagrecimento, contudo, na tentativa de acelerar a perda de peso, é comum a utilização de dietas restritivas, insustentáveis a longo prazo e que resultam em ganho de peso. **Objetivo:** Investigar se a substituição de uma dieta rica em gordura por uma dieta normolipídica (padrão), não restritiva, é capaz de contribuir para a melhora da composição corporal, da homeostase glicêmica e da esteatose hepática de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Em uma primeira fase, os animais foram separados em dois grupos, um que recebeu dieta hiperlipídica e outro que recebeu dieta padrão, por 8 semanas. Na segunda fase, metade dos animais que estavam com dieta hiperlipídica tiveram a alimentação substituída por dieta padrão. O peso corporal foi aferido semanalmente, assim como foram realizados testes de avaliação da ingestão alimentar e de tolerância à glicose e à insulina. Os animais foram eutanasiados após 8 semanas da intervenção dietética e um fragmento do tecido hepático foi extraído para a realização de análise histológica. **Resultados:** A dieta hiperlipídica induziu a obesidade, com ganho de peso substancial, e alterações metabólicas, como: hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática. Por outro lado, a substituição por dieta padrão não influenciou no consumo calórico total diário, contudo o consumo alimentar no período diurno foi menor no grupo alimentado com dieta padrão. Além disso, a intervenção dietética reestabeleceu o peso corporal, normalizou a glicemia, perfil lipídico e minimizou a esteatose hepática. **Conclusão:** Intervenções dietéticas menos restritivas, baseada em dietas balanceadas em macronutrientes são efetivas no tratamento da obesidade e comorbidades.

Palavras-Chave: obesidade; dietoterapia; dieta hiperlipídica; fígado gorduroso



## ABSTRACT

MELO, V.C.S. **Effects of replacing a high-fat diet to a standard diet on glycemic homeostasis and hepatic steatosis in mice.** 63 páginas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2024

The consumption of ultra-processed foods, high in fat, has contributed to the global increase in obesity and other metabolic disorders resulting from excess adipose tissue, including Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Physical exercise and dietary reeducation constitute first-line treatment for weight loss; however, in an attempt to accelerate weight loss, the use of restrictive diets is common, which are unsustainable in the long term and result in weight regain. **Objective:** To investigate whether replacing a high-fat diet with a normolipidic (standard), non-restrictive diet can contribute to improving body composition, glycemic homeostasis, and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. **Methods:** In the first phase, the animals were divided into two groups, one receiving a high-fat diet and the other a standard diet, for 8 weeks. In the second phase, half of the animals on the high-fat diet had their food replaced with a standard diet. Body weight was measured weekly, and tests were performed to assess food intake and glucose and insulin tolerance. The animals were euthanized after 8 weeks of dietary intervention, and a fragment of liver tissue was extracted for histological analysis. **Results:** The high-fat diet induced obesity, with substantial weight gain, and metabolic alterations, such as hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. On the other hand, replacing it with a standard diet did not influence total daily caloric intake, but food consumption during the daytime was lower in the group fed the standard diet. Furthermore, dietary intervention restored body weight, normalized blood glucose, lipid profile, and minimized hepatic steatosis. **Conclusion:** Less restrictive dietary interventions, based on balanced macronutrient diets, are effective in treating obesity and comorbidities.

**Keywords:** obesity; dietary therapy; high-fat diet; fatty liver

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho Experimental .....	23
Figura 2 – Graus de Esteatose Hepática .....	26

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
2 OBJETIVOS .....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.1    Objetivos Específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1    Obesidade.....	15
3.1.1    Regulação da Homeostase Energética.....	16
3.2    Dieta Hiperlipídica e Obesidade.....	17
3.3    Obesidade, Inflamação Periférica e Resistência à Insulina .....	18
3.4    Obesidade e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA) .....	19
4 MÉTODO.....	22
4.1    Tipo de Estudo .....	22
4.2    Amostra.....	22
4.3    Desenho Experimental.....	22
4.4    Indução da Obesidade (fase 1).....	23
4.5    Intervenção Dietética (fase 2).....	23
4.6    Avaliação da Ingestão Alimentar .....	24
4.7    Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (ipGTT).....	24
4.8    Teste de Tolerância à Insulina (ITT) .....	24
4.9    Eutanásia .....	25
4.10    Dosagens Plasmáticas.....	25
4.11    Histologia do Fígado .....	25
4.12    Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1    Artigo Científico.....	28
6 CONCLUSÕES GERAIS .....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO 1.....	58
ANEXO 2.....	59
ANEXO 3.....	62

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença inflamatória, crônica, de baixo grau, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo que leva a alterações metabólicas prejudiciais à saúde. Apresenta origem complexa e multifatorial, estando relacionada a aspectos genéticos, ambientais e comportamentais, principalmente alimentação inadequada e sedentarismo (Cuppari, 2019). Em vista disso, a soma do processo de urbanização, em que as pessoas ficaram mais sedentárias, com a maior oferta de alimentos ultraprocessados, mais calóricos e palatáveis, resultou em um ambiente obesogênico (Brasil, 2014; Fisberg *et al.*, 2016; WHO, 2017; Nilson *et al.*, 2019), que foi ainda mais acentuado na pandemia da Covid-19, por conta dos *lockdowns* (Goitia *et al.*, 2022).

Dados recentes mostram que no Brasil 31,88% da população é obesa (Brasil, 2022), com uma projeção de que, caso nenhuma providência seja tomada, a obesidade alcance 41% da população até 2035 (WOF, 2023). Motivo de preocupação, porque, atrelada a ela, está uma série de comorbidades, tais como: dislipidemias, hipertensão arterial, *Diabetes Mellitus* do tipo 2 (DM2), Doença Hepática Gordurosa Não Alcolólica (DHGNA), entre outras (Brasil, 2014; Nilson *et al.*, 2019; JI *et al.*, 2021).

A coexistência dessas Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) com a obesidade ocorre, principalmente, por conta do excesso de tecido adiposo, em especial o visceral, que contribui para uma desregulação das vias de sinalização da insulina, levando à captação diminuída de glicose pelos tecidos periféricos, prejudicando suas funções (Esser *et al.*, 2014; Mancini, 2020; Kawai, Autieri, Scalia, 2021).

De acordo com Rabacow, Azeredo e Rezende (2019), aproximadamente 25,3% das principais mortes por DCNT e 14,9% de todas as mortes poderiam ser evitadas a cada ano no Brasil com a redução do Índice de Massa Corporal (IMC), pois uma perda de 5% a 10% do peso corporal de obesos tende a melhorar parcialmente as comorbidades (Mancini, 2020). Sendo assim, a obesidade deve ser tratada com atenção, e o balanço energético negativo, em que as calorias ingeridas são menores do que o gasto calórico total, consiste na estratégia mais tradicional e menos invasiva para o emagrecimento (Marcelino, Patrício, 2011; Melby *et al.*, 2017; Rose *et al.*,

2021). Contudo, a elevada taxa de insucesso na perda e manutenção do peso corporal sugere que indivíduos obesos apresentam anormalidades metabólicas, que contribuem para um desequilíbrio energético e ganho de peso (Kawai, Autieri, Scalia, 2021).

Na literatura, a utilização de modelos experimentais animais, principalmente camundongos, para estudar a obesidade induzida por dieta é ampla, pois eles reproduzem em grande parte o que ocorre na doença humana e, além disso, o tamanho pequeno, a alta fecundidade, o ambiente controlado e o ciclo de vida curto contribuem para a realização das pesquisas (Kleinert *et al.*, 2018). Por isso, é possível encontrar diversos relatos sobre os efeitos da alteração de dieta (de hiperlipídica para padrão) na reversibilidade da obesidade de camundongos C57BL/6. No entanto, eles são conflitantes, porque a metodologia difere em composição das dietas, tempo de exposição e idade dos animais, o que parece influenciar na melhora da obesidade e comorbidade em alguns trabalhos (Baiges-Gaya *et al.*, 2022; Siersbæk *et al.*, 2017; Hatzidis *et al.*, 2017) ou na manutenção da obesidade, mesmo após a intervenção dietética (Guo *et al.*, 2022).

Analisando esse contexto e sabendo que o excesso de tecido adiposo e uma alimentação hiperlipídica têm relação com neuroinflamação e resistência hipotalâmica crônica aos sinais de hormônios anorexígenos e pró-termogênicos (Waise *et al.*, 2015), este trabalho pretende investigar se a obesidade e suas comorbidades seriam completamente revertidas caso uma dieta obesogênica fosse removida e substituída por uma que, em um primeiro momento, não geraria ganho de peso. Ou seja, melhorar a composição nutricional da dieta, saindo de uma dieta rica em gorduras para uma normocalórica e equilibrada em macronutrientes pelo mesmo período é uma estratégia adequada para o emagrecimento, restabelecimento da homeostase glicêmica e da DHGNA?

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar em camundongos obesos por dieta hiperlipídica se a substituição de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica por uma normocalórica e normolipídica influencia na composição corporal, na homeostase glicêmica e na histologia do fígado.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica no peso corporal (fase 1 – indução da obesidade).
- Avaliar o efeito da substituição de dieta hiperlipídica para dieta padrão no peso corporal (fase 2 – intervenção dietética).
- Relacionar a dieta/intervenção dietética com a homeostase glicêmica e seus parâmetros (tolerância à glicose, tolerância à insulina e a concentrações plasmáticas de glicose).
- Comparar a ingestão alimentar (em kcal) entre os grupos experimentais, relacionando-a com a evolução do peso corporal e o tipo de dieta/intervenção.
- Relacionar a dieta/intervenção dietética com as concentrações plasmáticas e hepáticas de lipídeos (triglicerídeos – TG e colesterol – COL).
- Avaliar a presença (ou não) de esteatose hepática e comparar os estágios de progressão da doença entre os grupos experimentais.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Obesidade

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de gordura corporal que representa risco à saúde (Cuppari, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017), o IMC, calculado pela divisão do peso (em quilos) pela altura ao quadrado (em metros), é um parâmetro para se diagnosticar estado nutricional, sendo que para adultos um índice acima de 25kg/m<sup>2</sup> indica sobrepeso, e valores acima de 30kg/m<sup>2</sup>, obesidade.

A prevalência da obesidade tem crescido no mundo todo atingindo proporções epidêmicas. De acordo com o Atlas Mundial da Obesidade (WOF, 2023), caso a tendência atual se mantenha, estima-se que, entre 2020 e 2035, o percentual de obesos entre a população mundial suba de 14% para 24% com um aumento mais representativo entre crianças e adolescentes.

Essa elevação expressiva da obesidade representa um problema de saúde pública, uma vez que, atrelada a essa condição, encontra-se uma série de DCNTs, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, alguns tipos de cânceres, DM2, DHGNA, osteoartrites, apneia do sono, entre outras, o que, além de prejudicar a qualidade de vida das pessoas, diminuir a produtividade e a expectativa de vida, também representa custo e sobrecarga aos sistemas de saúde (Nilson *et al.*, 2019; WHO, 2017). Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2022), dos 6 bilhões de reais que foram gastos em 2019 com o tratamento de DCNT, aproximadamente 22%, ou seja, 1,5 bilhão de reais tinham relação com sobrepeso e obesidade.

Ainda mais preocupante é o aumento da adiposidade entre crianças e adolescentes, uma vez que perder e manter o peso após emagrecimento é difícil e, por isso, o excesso de peso na infância está fortemente relacionado à presença de obesidade na vida adulta (Macleane *et al.*, 2005).

Apesar de a etiologia da obesidade ser complexa e multifatorial, abrangendo aspectos genéticos, ambientais, socioculturais e comportamentais, o fator-chave para o ganho de peso parece ser um balanço energético positivo em que há um consumo calórico maior do que o gasto energético (Cuppari, 2019). Isso explica, em parte, o aumento da população obesa que, devido ao processo de urbanização, ficou mais sedentária e propensa a comer alimentos hipercalóricos e ultraprocessados (Brasil,

2014; Fisberg *et al.*, 2016; WHO, 2017; Nilson *et al.*, 2019). Ademais, os *lockdowns*, durante a pandemia da Covid-19, também contribuíram para a inatividade física e para o aumento do “comer emocional” (Goitia *et al.*, 2022).

Dessa forma, de maneira simplista, parece claro que para emagrecer bastaria realizar um balanço energético negativo com restrição calórica e aumento da atividade física; contudo a maioria dos indivíduos tem dificuldade em atingir e manter essa perda de peso a longo prazo (Maclean *et al.*, 2005).

### 3.1.1 Regulação da Homeostase Energética

Em condições fisiológicas normais, o peso corporal tende a se manter relativamente estável graças a um complexo sistema fisiológico que atua, principalmente, por meio da integração de sinais periféricos a centros hipotalâmicos, reguladores da fome/saciedade e do gasto energético (Maclean *et al.*, 2005).

As concentrações de leptina e insulina são dois desses sinais periféricos enviados ao hipotálamo e estão relacionadas ao estoque periférico de energia, pois refletem a massa do tecido adiposo (Velloso, Araújo, Souza, 2008). Já as concentrações dos hormônios colecistocinina (CCK), peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), e grelina carregam informações a respeito da disponibilidade de nutrientes advindos da alimentação (Mancini, 2020).

Ao atingirem o hipotálamo, mais especificamente o núcleo arqueado (ARQ), esses hormônios ligam-se a receptores expressos em duas subpopulações de neurônios: uma que expressa neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), e outra que expressa pró-ópio-melanocortina (POMC) e o transcrito relaciona à cocaína e à anfetamina (CART) (Souza *et al.*, 2005; Velloso; Araújo; Souza, 2008).

Durante os períodos de jejum, ou quando os estoques periféricos de energia estão baixos – portanto, quando há uma diminuição das concentrações de insulina e de leptina e aumento da grelina – a expressão dos neurônios POMC/CART é inativada, e os NPY/AgRP são ativados, estimulando o núcleo lateral a liberar orexina e o hormônio concentrador de melanina (MCH), que aumentam a fome e inibem a termogênese, respectivamente. De maneira oposta, em período pós-prandiais, caracterizado pelo aumento das concentrações de insulina, CCK, GLP-1 e queda da grelina, ou quando os estoques de energia estão elevados e quando há um aumento



de leptina, os neurônios NPY/AgRP são inativados, enquanto POMC/CART estão ativos e estimulam a liberação do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo núcleo paraventricular, que, além de inibirem a fome (anorexígenos), também são pró-termogênicos (Souza *et al.*, 2005).

Se por um lado, em condições fisiológicas normais, a regulação da homeostase energética ocorre de maneira tão precisa, por outro, uma alimentação rica em gorduras e o excesso de tecido adiposo podem desencadear uma série de disfunções metabólicas, entre elas destacam-se a inflamação hipotalâmica e a resistência à insulina (RI), que prejudicam o emagrecimento e ainda contribuem para a obesidade (Jais; Brüning, 2017; Kawai, Autieri, Scalia, 2021).

### **3.2 Dieta Hiperlipídica e Obesidade**

Como relatado anteriormente, a obesidade ocorre, principalmente, quando há um balanço energético positivo, ou seja, quando o consumo calórico é maior do que o gasto energético (Cuppari, 2019). No entanto, tanto estudos epidemiológicos (Musso *et al.*, 2003; Toshimitsu *et al.*, 2007) quanto experimentais (Wilde *et al.*, 2009; Baiges-Gaya, 2022; Tordoff, Ellis, 2022) mostram que não é somente a densidade energética da dieta que importa para o ganho de peso e para o desenvolvimento de comorbidades, mas a composição de macronutrientes da própria dieta.

Nesse sentido, o modelo experimental de obesidade animal induzida por dieta hiperlipídica é amplamente empregado para a realização de estudos que visam a uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade. São utilizados, sobretudo, camundongos da linhagem C57BL/6, pois suas alterações metabólicas são muito semelhantes ao fenótipo da doença humana (Kleinert *et al.*, 2018; Stott; Marino, 2020) com desenvolvimento de hiperinsulinêmica, hiperglicemia, danos hepáticos (Aydos *et al.*, 2019) e inflamação hipotalâmica (Thaler *et al.*, 2012).

Antes mesmo de o consumo da dieta hiperlipídica acarretar aumento de peso corporal, ele provoca uma inflamação em áreas hipotalâmicas críticas para a homeostase energética (Thaler *et al.*, 2012). Como resultado, a sinalização anorexígena da insulina é prejudicada (Souza *et al.*, 2005), os neurônios POMC sofrem apoptose e os AgRP são regulados positivamente, ocasionando hiperfagia e contribuindo para um desequilíbrio energético (Jais; Brüning, 2017).

Waise *et al.* (2015) observaram que, em camundongos C57BL/6 com seis semanas de vida, a administração de um único dia de dieta hiperlipídica, composta por 60% de lipídios, 20% de carboidrato e 20% de proteína, aumentou a expressão de biomarcadores pró-inflamatórios no gânglio nodoso e no hipotálamo. De maneira semelhante, Thaler *et al.* (2011) verificaram que ratos apresentaram aumento de IL-6 e TNF $\alpha$  logo nos primeiros três dias de administração de uma dieta composta por 60% de lipídios.

Essa inflamação hipotalâmica de baixo grau, além de prejudicar o controle central da fome/saciedade, também influencia no funcionamento de tecidos periféricos como, as ilhotas pancreáticas. Arruda *et al.* (2011) notaram que ratos tratados, intracerebroventricular, com baixas doses de TNF $\alpha$  apresentaram glicemia normal, porém com ativação reduzida de mediadores das vias de sinalização de insulina (IRS1 e FOXO1) e hiperinsulinemia, características normalmente presentes na obesidade e relacionadas à RI, intolerância à glicose e *Diabetes Mellitus* do tipo 2 (DM2).

### **3.3 Obesidade, Inflamação Periférica e Resistência à Insulina**

Na obesidade, os adipócitos são o principal local de armazenamento do excesso de energia e, por isso, ficam hipertrofiados, o que causa hipoperfusão e hipóxia, ativando vias que levam a maior liberação de citocinas pró- inflamatórias, tais como TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), IL6 (interleucina 6), IL1 (interleucina 1) e MCP-1 (proteína de quimioatração de monócitos) (Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015; Kawai; Autieri; Scalia, 2021; Russo *et al.*, 2021). Esse ambiente inflamatório tem relação com uma diminuição da sensibilidade de diferentes tecidos ao efeito metabólico da insulina (Francisqueti; Nascimento; Corrêa, 2015).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e armazenado pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans. No pâncreas, secretam esse hormônio em resposta ao aumento das concentrações circulantes de nutrientes, em especial a glicose (Guyton; Hall, 2011). Em condições normais, quando a concentração de glicose circulante aumenta, as células  $\beta$  pancreáticas captam-na por meio do transportador de glicose 2 (GLUT2). Então, sua metabolização intracelular gera um aumento da proporção entre adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), que desencadeia o fechamento de canais de potássio ATP dependentes, causando despolarização e abertura de canais de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e de Sódio (Na<sup>+</sup>) voltagem dependentes. O rápido

influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  leva a translocação e a fusão dos grânulos de insulina na membrana plasmática, resultando em exocitose e distribuição via corrente sanguínea para agir em tecidos-alvos, como o músculo esquelético, o fígado e o tecido adiposo (Komatsu *et al.*, 2013; Kalwat; Cobb, 2017; Galicia-Garcia *et al.*, 2020).

No músculo esquelético e no tecido adiposo, a insulina se liga a um receptor específico de membrana e ativa uma cascata de reações que culminam na translocação do transportador de glicose 4 (GLUT 4) até a membrana, permitindo a entrada da glicose por difusão facilitada e, assim, diminuindo a glicemia plasmática (Kalwat; Cobb, 2017). Além disso, exerce função anabólica, inibindo a glicogenólise hepática e estimulando tanto a síntese de glicogênio muscular e hepático quanto o estoque de triglicerídeos (TG) pelo tecido adiposo (Carvalho; Zecchin; Saad, 2002; Marzocco; Torres, 2007; Esser *et al.*, 2014; Kawai; Autierl; Scalia, 2021).

Contudo, na obesidade, o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, somada à redução de adipocinas e à elevação da concentração de ácidos graxos livres (AGL) circulantes, leva a um quadro de resistência à insulina (RI), em que o funcionamento da via de sinalização da insulina é prejudicado, resultando em diminuição da translocação de GLUT 4 para a superfície e uma menor captação de glicose. Com isso, ocorre hiperglicemia que, na maioria das vezes, é corrigida com um aumento compensatória na secreção de insulina (hiperinsulinemia), que, a longo prazo, pode levar as células  $\beta$  pancreáticas à falência por exaustão, evoluindo o quadro de RI para tolerância alterada à glicose e, enfim, DM2 (Mahan; Escott-Stump; Raymond, 2013; Mancini, 2020; Fahed *et al.*, 2022).

### **3.4 Obesidade e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)**

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das principais causas de doença hepática crônica no mundo e, assim como a DM2, está intimamente associada à RI e à obesidade, sendo encontrada em até 91% das pessoas com obesidade grave ( $\text{IMC} > 35 \text{kg/m}^2$ ) (Aydos *et al.*, 2019; Juanola *et al.*, 2021). Ela compreende um amplo espectro de danos ao fígado relacionados à lesão de hepatócitos, processos inflamatórios e fibrose (Pouwels *et al.*, 2022). Sendo assim, varia desde uma simples esteatose hepática até progressões mais graves como esteato hepatite não alcoólica (EHNA), cirrose e hepatocarcinoma (Liang *et al.*, 2014; Esser *et al.*, 2014; Juanola *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022).

O fígado é um órgão fundamental para o metabolismo dos macronutrientes, responsável pela síntese, armazenamento e redistribuição de lipídios, aminoácidos e glicose, de maneira altamente coordenada, regulada pela disponibilidade e necessidade energética (Siersbæk *et al.*, 2017). Por isso, o desenvolvimento de DHGNA está associado, entre outros fatores, ao consumo de uma dieta rica em gorduras (Musso *et al.*, 2003; Hatzidis *et al.*, 2017; Velazquez *et al.*, 2019). Um estudo epidemiológico observou que pacientes com EHNA apresentaram uma dieta mais rica em gordura saturada e colesterol do que indivíduos saudáveis, com mesma idade, sexo e IMC (Musso *et al.*, 2003).

Os estados de jejum e alimentado afetam o funcionamento do fígado, principalmente, de três modos distintos. São eles: 1) alterando seu estado de armazenamento de glicogênio para degradação de acordo com as variações de glicemia, de insulina e de glucagon plasmáticos; 2) utilizando ácidos graxos como fonte de energia interna por meio de vias oxidativas ou fornecendo energia a outros órgãos a partir de corpos cetônicos; 3) eliminando moléculas nitrogenadas reativas, derivadas do metabolismo de aminoácidos (Trefts *et al.*, 2017).

Na obesidade, o fígado apresenta uma espécie de resistência seletiva à insulina, uma vez que a falta de sensibilidade a esse hormônio prejudica sua capacidade de captar a glicose e sintetizar glicogênio, mas estimula a via da lipogênese de novo e aumenta a concentração de TG hepático pelo fato de que hiperinsulinemia ativa o SREBP-1 (fator de transcrição de ligação ao regulador de esterol 1) (Carvalho; Zecchin; Saad, 2002; Liang *et al.*, 2014; Esser *et al.*, 2014; Trefts *et al.*, 2017; Juanola *et al.*, 2021). Esse excesso de gordura no fígado leva à disfunção mitocondrial, aumento do estresse oxidativo, lipotoxicidade e resposta inflamatória, típicos da DHGNA (Guo *et al.*, 2022).

O emagrecimento, por meio de uma alimentação balanceada e da prática de exercícios físicos, é a principal estratégia para o tratamento da DHGNA, tendo em vista que existe uma relação dose-resposta entre a magnitude da perda de peso e a melhora da esteatose hepática (Moreira, 2017). Contudo, não está bem estabelecido se as demais alterações metabólicas da obesidade, induzidas pela dieta hiperlipídica, também são revertidas com a perda de peso. Hovarth *et al.* (2014) avaliaram amostras de tecido hepático de 21 indivíduos pré e pós-cirurgia bariátrica e perceberam que, apesar de uma diminuição significativa do IMC, a rápida perda de peso não foi suficiente para reverter a aceleração da idade epigenética. Em contrapartida,

Siersbæk *et al.* (2017) observaram que a substituição de uma dieta hiperlipídica por uma dieta padrão normalizou o peso corporal e reverteu a esteatose hepática de camundongos.

Com relação aos experimentos de obesidade animal induzida por dieta hiperlipídica, a falta de padronização nos estudos, no que tange à idade, quantidade de animais por grupo, tempo de adaptação, duração do experimento e percentual de lipídios, prejudica a comparação entre eles em alguns estudos, sendo relatada melhora da obesidade e comorbidades (Baiges *et al.*, 2022; Siersbæk *et al.*, 2017; Hatzidis *et al.*, 2017), e, em outros, obesidade persistente (Guo *et al.*, 2019).

## **4 MÉTODO**

### **4.1 Tipo de Estudo**

Trata-se de uma pesquisa básica de natureza experimental, realizada por meio de uma abordagem quantitativa.

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus de Cascavel, de março de 2022 a agosto 2023.

Todos os procedimentos foram aprovados e seguiram as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIOESTE (em ANEXO).

### **4.2 Amostra**

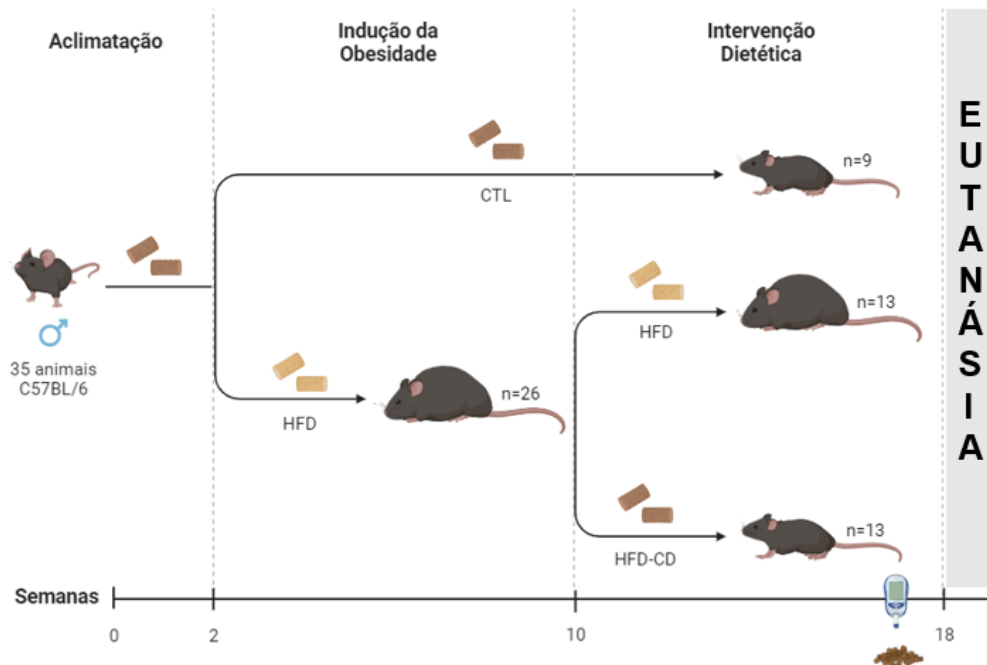
A amostra foi composta por 35 camundongos machos da linhagem C57BL/6 com aproximadamente seis semanas de vida e peso corporal médio de 20g, oriundos do biotério central da UNIOESTE e mantidos no biotério setorial do LAFEM.

Os animais foram alocados em caixas, contendo dois ou três camundongos, em condições de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luminosidade (12 horas claro/escuro) controladas. Durante as duas primeiras semanas, todos receberam dieta padrão e água à vontade para aclimatarem. Após o período de aclimação, os animais foram separados, aleatoriamente, em dois grupos, sendo eles: 1) CTL, contendo nove animais, que receberam dieta padrão durante todo o experimento; 2) HFD, contendo 26 animais, que receberam dieta hiperlipídica para induzir à obesidade. Depois oito semanas recebendo dieta hiperlipídica, foi feita uma intervenção dietética com metade dos animais do grupo HFD, trocando a ração para dieta padrão, formando então o grupo HFD-CD, com 13 animais.

### **4.3 Desenho Experimental**

A Figura 1 elucida melhor as etapas do trabalho, mostrando a ordem ao longo do tempo. Os procedimentos serão detalhados nos próximos tópicos.

**Figura1 - Desenho Experimental.** Evolução do experimento apresentando todas as fases da pesquisa de acordo com o tempo (em semanas de experimento). Indução da obesidade por HFD durante oito semanas após aclimatação. Seguida de intervenção dietética (retorno ou não à dieta padrão) pelo mesmo período. IpGTT, ITT e avaliação da ingestão alimentar na semana anterior à eutanásia.



Fonte: a autora (adaptado de [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

#### 4.4 Indução da Obesidade (fase 1)

Para induzir à obesidade, os animais do grupo HFD receberam dieta hiperlipídica, composta por 37,9% de lipídeos e densidade energética de 6,23 kcal/g.

A dieta hiperlipídica foi preparada no LAFEM, composta por 50% de dieta padrão triturada; 14,8% de caseína; 4% de óleo de soja; e 31,2% de banha de porco (adaptado de Yang *et al.*, 2015).

Os animais do grupo CTL receberam dieta padrão (Supralab, Brasil) com 3,8 kcal/g obtida no Biotério Central da UNIOESTE, composta por 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de gorduras. Para acompanhamento da evolução do peso corporal, todos os animais foram pesados semanalmente.

#### 4.5 Intervenção Dietética (fase 2)

Na fase 1 do experimento, o grupo CTL serviu como parâmetro para constatar a obesidade do grupo HFD. Verificada a obesidade, após oito semanas de dieta hiperlipídica, iniciou-se a fase 2, com metade dos animais do grupo HFD trocando a

alimentação para dieta padrão, dando origem ao grupo HFD-CD.

#### **4.6 Avaliação da Ingestão Alimentar**

A ingestão alimentar foi avaliada na penúltima semana de experimento, ou seja, na 7ª semana após a intervenção dietética e na 23ª semana de vida dos camundongos. Para isso, os animais foram alocados em caixas individuais, e o consumo alimentar foi registrado a partir da subtração entre a quantidade de ração ofertada e o seu resíduo, a cada 12 horas, por três dias, estabelecendo os horários de 7h e 19h para registro. Os resultados apresentados foram obtidos pela média do consumo, expressos em kcal/12h ou kcal/24h.

#### **4.7 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (ipGTT)**

A tolerância à glicose foi avaliada por meio do ipGTT na 23ª semana de vida dos camundongos. Para tanto, os animais foram submetidos a 8 horas de jejum prévio. Por meio de um picote na cauda dos camundongos e com o auxílio de um glicosímetro, foi aferida a glicemia de jejum (tempo 0). Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose na concentração de 2g/kg de peso corporal para a verificação da glicemia aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração.

#### **4.8 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)**

Dois dias depois do ipGTT e após 2 horas de jejum, os camundongos foram submetidos ao ITT. Por meio de um picote na cauda dos camundongos, e com o auxílio de um glicosímetro, foi aferida a glicemia de jejum (tempo 0). Em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina na concentração de 0,75U/kg de peso corporal. A tolerância foi avaliada de acordo com a glicemia nos tempos 3, 6, 9, 12, 15 e 21 minutos após a administração da injeção. Ao final do teste, os animais receberam 100ul de glicose a 50% para evitar hipoglicemia e ficaram em observação durante uma hora.



## 4.9 Eutanásia

Após oito semanas da intervenção dietética, os animais foram eutanasiados. Para isso, foram anestesiados com 9mg/kg de cloridrato de xilazina e 90mg/kg de cloridrato de ketamina. Constatada a sedação, foram decapitados. O sangue total foi coletado em tubos heparinizados, e os tecidos (fígado e gorduras retroperitoneal e perigonadal), extraídos, pesados e armazenados para posteriores análises.

## 4.10 Dosagens Plasmáticas

O plasma foi utilizado para dosagem de glicose, triglicerídeos e colesterol por meio de kits colorimétricos comerciais (Bioclin, Quibasa, Brasil), seguindo instruções do fabricante. O TG plasmático foi utilizado, em conjunto com a glicemia de jejum, para predizer resistência à insulina por meio do cálculo do Índice de TyG, representado por:  $LN [(TG \times \text{glicemia de jejum})/2]$  (Guerreiro-Romero *et al.*, 2010).

## 4.11 Histologia do Fígado

Um fragmento do lóbulo hepático esquerdo foi coletado de cada animal em corte transversal do centro em direção à margem do órgão. As amostras foram fixadas em solução de formalina de Carson [formaldeído 37% em peso (10%), metanol (1,5%) e PBS, pH 7,4 (88,5%)] por 24 horas e depois lavadas em água corrente antes de serem desidratadas em concentrações crescentes de álcool. As amostras foram então diafanizadas em xilol e embebidas e incluídas em Paraplast® (Sigma Co, St Louis, MO). Seções de 7µm de espessura foram cortadas em micrótomo rotativo manual (Olympus 4060) equipado com navalha. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise de esteatose hepática, baseada na classificação de Brunt, com modificações para roedores (Figura 2).

As imagens foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX61) equipado com câmera digital (Olympus DP71) e *software* DP Controller 3.2.1.276.

**Figura 2 - Graus de Esteatose Hepática.** Divididos em quatro graus de acordo com a percentagem que cada alteração representa no campo analisado.

Característica Histológica	Score			
	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Esteatose <u>macrovesicular</u>	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Esteatose <u>microvesicular</u>	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Hipertrofia	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Nº de focos inamatórios	<0,5	0,5-1,0	1,0-2,0	>2,0

**Fonte:** Adaptado de Liang *et al.*, 2014

#### 4.12 Análise Estatística

Os dados obtidos foram testados de acordo com o pressuposto de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Constatada a normalidade, procedeu-se a avaliação por meio de Teste T (para análise de apenas dois grupos: CTL e HFD) ou Anova de uma via (quando os três grupos CTL, HFD e HFD-CD foram avaliados) com pós-teste de Tukey. Para os casos que não atenderam esse pressuposto, utilizou-se o Mann-Whitney *Test* para a avaliação de dois grupos, ou o Kruskal-Wallis para avaliar os três grupos em conjunto. A estatística e os gráficos aqui apresentados foram desenvolvidos por meio do programa GraphPad Prism 8.0.2 com  $p < 0,05$  adotado como critério de significância em todos os testes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção contempla os resultados da pesquisa, os quais serão apresentados e discutidos no formato de artigos científicos.

**Artigo 1:** *The Normocaloric Diet Reduces Daytime Food Intake in Obese Mice due a High-Fat Diet and Normalizes Fat Accumulation and Metabolic Parameters*

## 5.1 Artigo Científico

### **THE NORMOCALORIC DIET REDUCES DAYTIME FOOD INTAKE IN OBESE MICE DUE A HIGH-FAT DIET AND NORMALIZES FAT ACCUMULATION AND METABOLIC PARAMETERS**

Replacement of a high-fat diet to a normocaloric diet reverses obesity in mice

Vanessa Cristina de Souza Melo <sup>1</sup>, Jean Franciesco Vettorazzi <sup>2</sup>, Julia Nicolý Bohn Couto <sup>1</sup>, Julia Martins Cabreira <sup>1</sup>, Sandra Lucinei Balbo<sup>1,3</sup>

Center for Biological and Health Sciences - State University of Western Paraná  
(UNIOESTE – Campus Cascavel)

1 – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE – Campus Cascavel)

2 – Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA)

3 – Corresponding author:

PhD Sandra Lucinei Balbo

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

Rua Universitária, 2069 Zip code: 85819-110 – Cascavel, PR, Brazil

Phone: (55 45) 3220-3257

E-mail: slbalbo@hotmail.com

## ABSTRACT

The consumption of ultra-processed foods, rich in fat, has contributed to the global increase in obesity and other metabolic disorders resulting from excess adipose tissue and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Physical exercise and dietary reeducation constitute the first-line treatment for weight loss; however, to accelerate weight loss, the use of restrictive diets is common but are unsustainable in the long term and result in weight regain. **Objective:** Evaluate the effects of replacing a high-fat diet to a normocaloric diet (*ad libitum*) on food intake, fat accumulation, glycemic homeostasis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Methods** Animals were divided into two groups one feed with high-fat diet and the other with standard diet for 8 weeks. Then, half of the animals on the high-fat diet had their food replaced for a standard diet. Body weight was measured weekly. After an additional 7 weeks, we assessed food intake and tested glucose and insulin tolerance. The animals were euthanized 8 weeks after the dietary intervention, and liver tissue was collected for histological analysis. **Results:** The high-fat diet induced obesity and metabolic changes such as hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. The replacement for a standard diet, even without influencing total caloric intake, reduced food intake during the day and was able to restore body weight, normalize blood glucose and lipid profile, beyond improve the hepatic steatosis. **Conclusion:** Less restrictive dietary interventions, based on macronutrient balanced diets, are effective in the treatment of obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.

**Keywords:** obesity, high-fat diet, diet therapy, NAFLD, weight loss; food intake; glycemic homeostasis.

## INTRODUCTION

The consumption of ultra-processed foods, rich in sugars and fats, has been contributing to the increase in obesity worldwide <sup>(1,2,3,4)</sup>. At this rate, it is estimated that by 2035, more than 50% of the global population will be obese <sup>(5)</sup>, representing a significant public health problem because the excess adipose tissue is associated with the development of various Non-Communicable Chronic Diseases (NCDs), such as hypertension, Type 2 Diabetes Mellitus (DM2), and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), the leading cause of chronic liver disease globally <sup>(1,4,6)</sup>.

The liver is an organ that operates in a highly coordinated and dynamic manner to regulate the metabolism of macronutrients according to hormonal, neural, and dietary stimuli <sup>(7)</sup>. However, in obesity, an inflammatory state occurs, leading to metabolic changes that contribute to NAFLD, such as stimulation of de novo lipogenesis due to hyperinsulinemia, increased uptake of free fatty acids from adipose tissue lipolysis due to insulin resistance, along with mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress <sup>(6,8)</sup>.

Various strategies are being employed to combat obesity and comorbidities such as NAFLD. These include adopting healthier lifestyle habits, engaging in physical exercise, dietary reeducation, and more drastic measures like pharmacological treatment and bariatric surgeries <sup>(9,10)</sup>. However, it is common for highly restrictive diets to be used to achieve a quick solution to obesity, which are generally unsustainable in the long term and often followed by weight regain <sup>(11)</sup>.

Some diets, such as the hypocaloric Mediterranean diet, are well-accepted in the treatment of NAFLD, as are certain foods like coffee and the modulation of the microbiota <sup>(12)</sup>. In this context, diets of high quality could reduce NAFLD cases.

Therefore, there is a question about the improvement in the nutritional composition of diets, moving from a high-fat diet to a normocaloric and balanced diet in macronutrients for the treatment of obesity and its comorbidities like NAFLD. In this sense, we aimed to evaluate the effects of replacing a high-fat diet (HFD) to a normocaloric diet (CD) (*ad libitum*) on food intake, fat accumulation, glycemic homeostasis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD).

## **METHODS**

### **Study Period**

The experiments were conducted from April 2022 to June 2023.

### **Animals**

All experiments were approved by the University's Ethics Committee on Animal Use (CEUA – State University of Western Paraná - UNIOESTE Protocol No. 22-20). Male C57BL/6 mice at 6 weeks of age (average weight of 20g) were housed in polypropylene boxes (30x20x13cm, 2-3 animals/box) under controlled temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and lighting conditions (12 hours light/dark). All animals underwent an acclimatization period (2 weeks) during which they received a standard rodent diet and water *ad libitum*.

## **Obesity Induction and Diet Composition**

After the acclimatization period, the animals were randomly divided into two groups: the control group (CTL, n=9) received a standard rodent diet (Supralab, Brazil; 70% carbohydrates, 20% proteins, 10% lipids; 3.8 kcal/g) throughout the experiment; and a high-fat diet group (HFD, n=26) received a high-fat diet for 8 weeks to induce obesity. The high-fat diet was prepared at the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism (LAFEM – UNIOESTE) and consisted of 50% ground standard diet, 14.8% casein, 4% soybean oil, and 31.2% lard (36.7% carbohydrates, 25.4% proteins, 37.9% lipids; 6.23 kcal/g).

## **Dietary Intervention**

After inducing obesity in the HFD group, a dietary intervention was conducted with half of the HFD group animals, where the high-fat diet was replaced with a standard diet, resulting in the high-fat diet-standard diet group (HFD-CD, n = 13), which continued on this diet for an additional 8 weeks.

## **Food Intake Assessment**

In the 7th week after the dietary intervention, the animals were individually housed, and food intake was recorded by subtracting the amount of offered feed from its residue every 12 hours for three days. The presented results were obtained by averaging the consumption, expressed in kcal.



### **Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT)**

The intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) was conducted 7 weeks after the dietary intervention. The animals underwent an 8-hour fast, and blood was collected from a tail snip for fasting glycemia measurement (time 0) using a glucose meter and test strips (Accu-Chek® Active, Roche, Brazil). Subsequently, the animals received an intraperitoneal injection of glucose at a concentration of 2g/kg body weight, and glycemia was measured at 15, 30, 60, 90, and 120 minutes after administration.

### **Insulin Tolerance Test (ITT)**

After a 2-hour fast, blood was collected from the tail for fasting glycemia measurement (time 0) using a glucose meter and test strips (Accu-Chek® Active, Roche, Brazil). Regular insulin (0.75 IU/kg) was administered intraperitoneally, and glycemia was measured again at 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 minutes after injection. At the end of the test, the animals received 100 µl of 50% glucose to prevent hypoglycemia and were observed for one hour.

### **Euthanasia**

At 8 weeks after the dietary intervention, the mice were weighed, anesthetized with xylazine (9 mg/kg) (Anasedan®, Vetbrands, Brazil), and ketamine (90 mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brazil). Once absent cutaneous reflex, naso-anal length was measured, and decapitation was performed. Blood was collected and transferred to Eppendorf tubes, centrifuged (12,600 g, 10 minutes, 4 °C), and plasma stored at -80

°C for triglyceride (TG) and cholesterol (COL) measurement using commercial colorimetric kits (Bioclin, Quibasa, Brazil). Subsequently, laparotomy was performed for extraction and weighing of retroperitoneal and perigonadal white adipose tissue and the liver.

### **Insulin Resistance**

Insulin resistance was calculated using the TyG index, associated with fasting glucose and TG, both in fasting conditions. Calculated by:  $\text{Ln}(\text{fasting TG [mg/dL]} \times \text{fasting plasma glucose [mg/dL]})/2$  (ref) <sup>(13)</sup>.

### **Liver Histology**

A fragment of the left hepatic lobe was collected from each animal, in a cross-section from the center towards the organ's margin. Samples were fixed in Carson's formalin solution (37% formaldehyde by weight (10%), methanol (1.5%), and PBS, pH 7.4 (88.5%)) for 24 hours and then washed in running water before being dehydrated in increasing concentrations of alcohol. Samples were then clarified in xylene, embedded, and included in Paraplast® (Sigma Co, St Louis, MO). 7µm thick slices were cut using a manual rotary microtome (Olympus 4060), equipped with a steel knife. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for hepatic steatosis analysis <sup>(14)</sup>. Images were analyzed under an optical microscope (Olympus BX61) equipped with a digital camera (Olympus DP71) and DP Controller 3.2.1.276 software.

## Data Analysis and Statistics

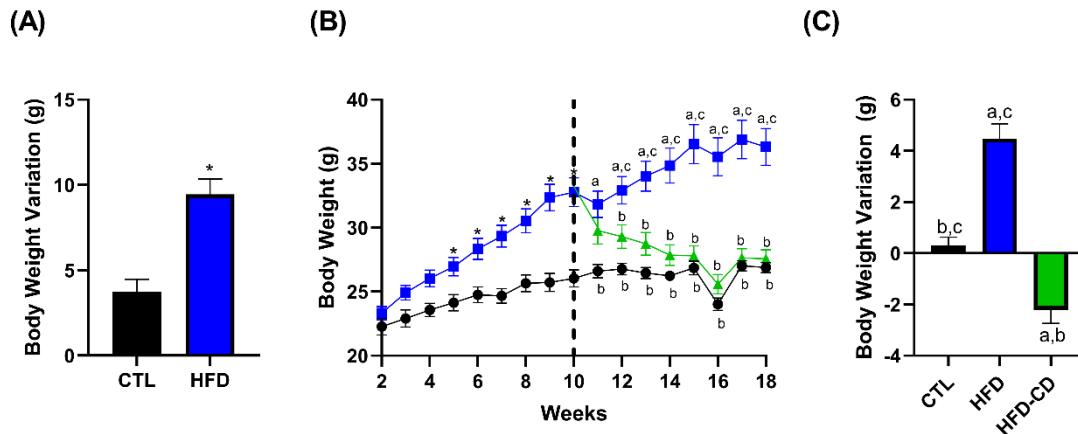
Data are presented as means  $\pm$  standard errors of the mean. The Shapiro-Wilk test was used for normality analysis. Parametric data were analyzed using unpaired Student's t-test or one-way ANOVA. Non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test. The significance level was set at  $p < 0.05$ , and analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software ©).

## RESULTS

### **Dietary intervention for eight weeks reduces the body weight of obese mice on a high-fat diet**

After eight weeks of a high-fat diet, the body weight gain in the HFD group was approximately 2.5 times higher compared to the CTL group (Fig. 1A), confirming obesity ( $p=0,0011$ ). In the tenth week (Fig. 1B), the animals in the HFD group were divided into two groups: HFD, which continued with the high-fat diet, and HFD-CD, which switched to a standard rodent diet for another eight weeks. Figure 1B represents the weight progression of obese animals on a high-fat or standard diet. It is observed that just two weeks after returning to the standard diet, the animals in the HFD-CD group already showed body weight statistically similar to the CTL group (Fig. 1B). The CTL group maintained relatively constant body weight over the eight weeks, while the HFD group continued to gain weight throughout the experiment. However, the HFD-

CD group exhibited a significant reduction in body weight after the dietary intervention (Fig. 1C).



**Figure 1. Effects of standard and high-fat diet on the body weight of mice.**

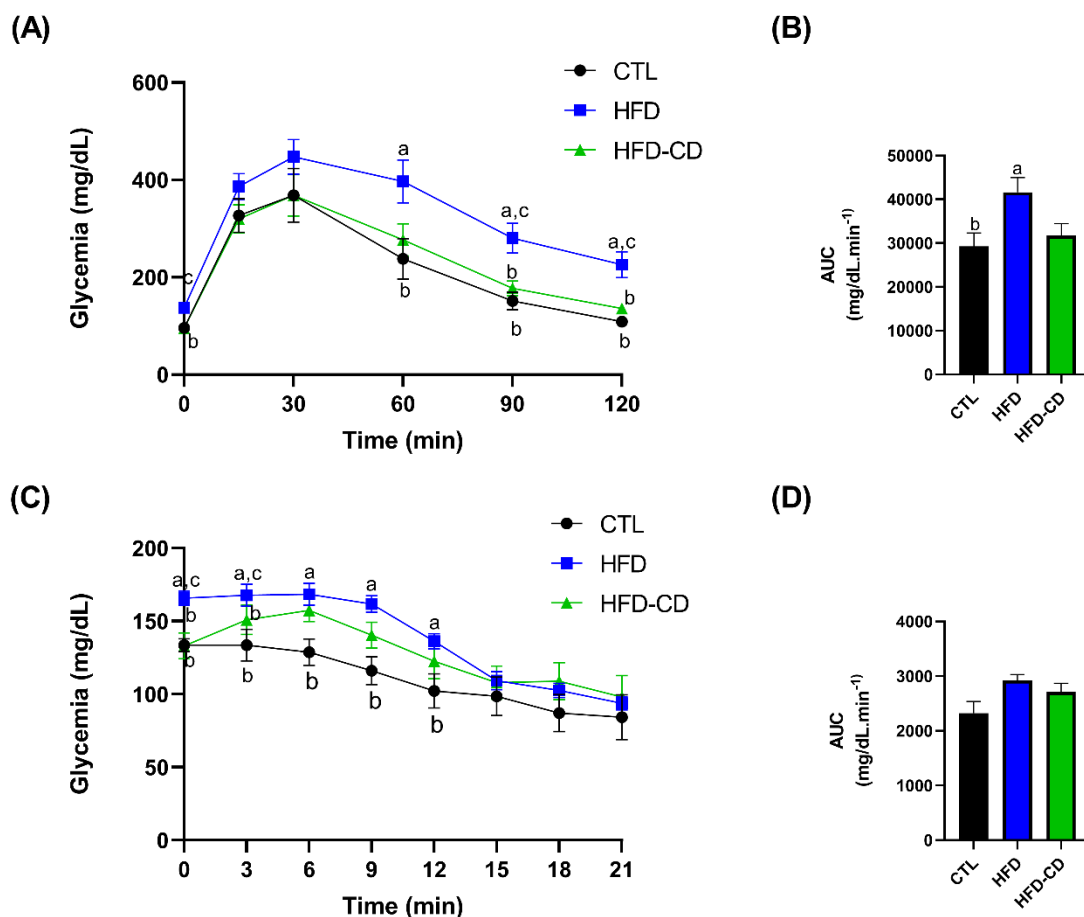
Variation in body weight during the induction of obesity (A). Evolution of body weight in mice fed a standard or high-fat diet (B). Variation in body weight after dietary intervention (C). Data presented as mean  $\pm$  SEM. Different letters represent statistical differences between groups: a (CTL, n=9), b (HFD, n=13), and c (HFD-CD, n=13).  $p < 0.05$  was adopted as the significance criterion.

### **Dietary intervention for eight weeks modestly improves glucose tolerance in obese mice**

Following glucose administration during the ipGTT, all three groups exhibited similar glycaemic peaks, and after 30 minutes, plasma glucose concentration began to decline. However, at 60, 90, and 120 minutes, the blood glucose levels of the HFD-CD group and the CTL group were similar, while the HFD group remained higher (Fig. 2A). Analyzing the area under the glycaemic curve during the ipGTT, it is observed that the

HFD-CD group showed a slight improvement in glucose tolerance, statistically similar to the CTL group (Fig. 2B).

During the ipITT, the area under the glycemic curve was similar between the groups (Fig. 2D). However, in the representative curve of the test (Fig. 2C), it is noted that the blood glucose of the HFD group remained higher than the CTL group until 12 minutes, and that of the HFD-CD group remained intermediate between the CTL and HFD groups. Fifteen minutes after insulin application, the plasma glucose of the three groups was similar until the end of the test (Fig. 2C).

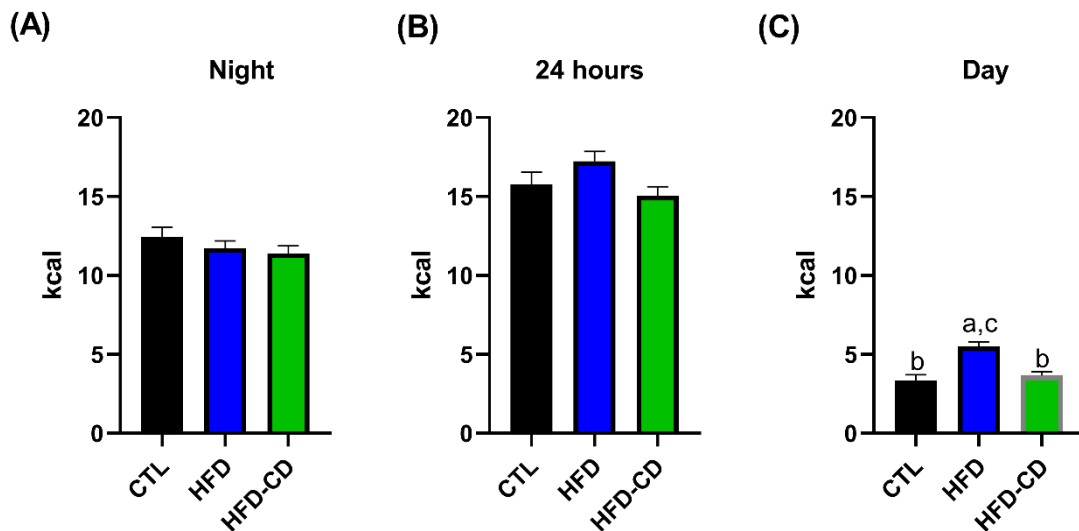


**Figure 2. Effect of dietary intervention on blood glucose during the glucose and insulin tolerance test in obese mice.** Blood glucose curve during intraperitoneal

glucose administration (A) and insulin (C), and area under the curve of blood glucose during ipGTT (B) and ipITT (D). Data presented as mean  $\pm$  SEM. Different letters represent statistical differences between groups: a (CTL, n=9), b (HFD, n=13), and c (HFD-CD, n=13).  $p < 0.05$  was adopted as the significance criterion.

**The food intake of obese mice on a high-fat diet is similar to that of lean mice during the nighttime and higher during the daytime**

Nighttime food intake (19:00 to 07:00h) (Fig. 3A) and over a 24-hour period (Fig. 3B) was similar among the three groups of studied animals. However, interestingly, the daytime food intake of the HFD group (from 7:00 to 19:00h) was significantly higher when compared to the CTL and HFD-CD groups (Fig. 3C).



**Figure 3. Comparison of food intake in animals with a high-fat or standard diet in three distinct periods.** Nighttime calorie consumption, from 7:00 PM to 07:00 AM (A). Caloric intake over a 24-hour period (B). Daytime calorie consumption, from 07:00 AM to 7:00 PM (C). Data presented in kcal as the mean  $\pm$  SEM of food intake over a

period of 3 complete days. Different letters represent statistical differences between groups: a (CTL, n=9), b (HFD, n=13), and c (HFD-CD, n=13).  $p < 0.05$  was adopted as the significance criterion.

### **Dietary intervention for eight weeks normalizes fat stores and biochemical parameters in obese mice on a high-fat diet**

Table 1 shows that body weight, perigonadal and retroperitoneal fat weight, fasting blood glucose, plasma triglycerides, cholesterol, and TyG index were significantly higher in the HFD group compared to the CTL group. Interestingly, after eight weeks of dietary intervention, all analyzed parameters in the HFD-CD group were statistically lower than the HFD group and similar to the CTL group (Table 1).

**Table 1. Biometric and Plasma Parameters analyzed eight weeks after dietary intervention**

	<b>CTL</b>	<b>HFD</b>	<b>HFD-CD</b>
Body Weight (g)	26,89 ± 0,39 <sup>b</sup>	36,3 ± 1,43 <sup>a,c</sup>	27,57 ± 0,7 <sup>b</sup>
Perigonadal Fat (mg/g de PC)	10,49 ± 0,63 <sup>b</sup>	49,33 ± 3,20 <sup>a,c</sup>	14,06 ± 1,71 <sup>b</sup>
Retro. Fat (mg/g de PC)	1,24 ± 0,30 <sup>b</sup>	11,68 ± 1,97 <sup>a,c</sup>	2,43 ± 0,59 <sup>b</sup>

Fasted Glycemia (mg/dL)	95,67 ± 5,90 <sup>b</sup>	137,2 ± 9,37 <sup>a,c</sup>	95,05 ± 3,14 <sup>b</sup>
Fed Glycemia (mg/dL)	123,4 ± 1,67	135,2 ± 4,78 <sup>c</sup>	118,6 ± 3,78 <sup>b</sup>
Plasma COL (mg/dL)	75,4 ± 4,46 <sup>b</sup>	127,8 ± 13,03 <sup>a,c</sup>	70,85 ± 7,56 <sup>b</sup>
Plasma TG (mg/dL)	53,34 ± 5,44 <sup>b</sup>	85,17 ± 7,50 <sup>a,c</sup>	57,38 ± 4,72 <sup>b</sup>
TyG Index	4,22 ± 0,10 <sup>b</sup>	4,72 ± 0,06 <sup>a,c</sup>	4,28 ± 0,04 <sup>b</sup>

Data presented as mean ± SEM. Different letters represent statistical differences between groups: a (CTL), b (HFD), and c (HFD-CD). Body weight, perigonadal fat, retroperitoneal fat, fed blood glucose: One-way ANOVA (CTL n=9; HFD n=13; HFD-CD n=13). Fasting blood glucose: Kruskal-Wallis (CTL n=9; HFD n=13; HFD-CD n=13). Plasma cholesterol (Plasma COL): One-way ANOVA (CTL n=5; HFD n=7; HFD-CD n=6). Plasma triglyceride (Plasma TG) and TyG index: Kruskal-Wallis (CTL n=5; HFD n=7; HFD-CD n=6).  $p < 0.05$  was adopted as the significance criterion.

### **Hepatic histology shows improvement in hepatic steatosis after eight weeks of dietary intervention in obese mice on a high-fat diet**

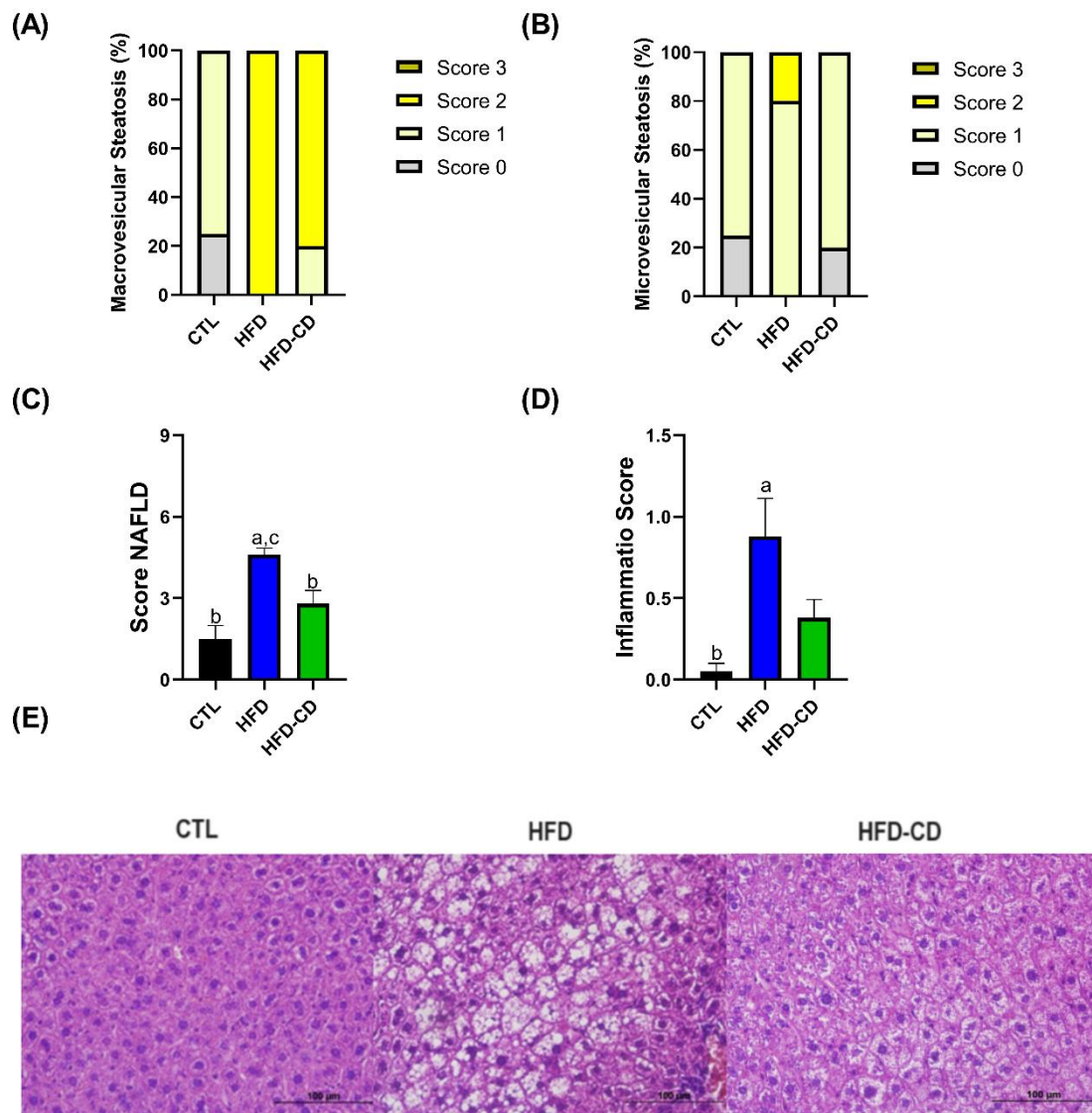
Photomicrographs of the liver (Fig. 4E), stained with H&E, were used to quantify the presence of macrovesicular and microvesicular steatosis based on the percentage of the total affected area (Fig. 4A and B).



Regarding macrovesicular steatosis, all assessed areas in HFD animals were classified as Score 2, while dietary intervention in the HFD-CD group resulted in slight improvement, reducing to Score 1 in 20% of the areas. CTL animals also presented macrovesicular steatosis Score 1 in 75% of the assessed areas (Fig. 4A).

Concerning microvesicular steatosis, 20% of the assessed areas in HFD animals had Score 2, and 80% had Score 1. Dietary intervention resulted in 80% of the assessed areas classified as Score 1 and 20% as Score 0, very similar to the CTL group, which had 75% in Score 1 and 25% in Score 0 (Fig. 4B).

Therefore, all three evaluated groups showed signs of NAFLD; however, the HFD group had the highest score on a scale of 0 to 9, with an average of 4.6. Dietary intervention was able to reverse the progression of the disease, and thus, the CTL and HFD-CD groups presented similar values (Fig. 4C). The most advanced stage of the disease in the HFD group was characterized by the presence of more inflammatory foci per field (Fig. 4D).



**Figure 4. Effects of dietary intervention on hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet.** Percentage of liver areas with macrovesicular (A) and microvesicular (B) steatosis. Scoring scale for NAFLD (C). Inflammatory foci per field (D). Photomicrograph of the liver stained with Hematoxylin and Eosin, magnification of 400x. Different letters represent statistical differences between groups: a (CTL n=4), b (HFD n=5), and c (HFD-CD n=5).  $p < 0.05$  was adopted as the significance criterion.

## DISCUSSION

Obesity has become a pandemic, and a diet high in fat, combined with a sedentary lifestyle, seems to be a crucial factor in explaining this population-wide weight gain. Contemporary diets are highly palatable, rich in fats and simple carbohydrates. These diets cause hypothalamic injuries that result in an imbalance between caloric intake and energy expenditure. How much longer a subject consumes this type of food, greater will be the imbalance and increased food intake, leading to a vicious circle that induces excessive weight gain, accompanied by various comorbidities<sup>15</sup>. A high-fat diet contributes to hypothalamic inflammation even before body weight gain<sup>16</sup>, and the reversal of obesity through caloric restriction leaves the NPY/AgRP axis more activated without promoting changes in POMC/CART, which may explain the difficulty in maintaining long-term weight loss<sup>(17,18)</sup>.

In our study, we observed that administering a high-fat diet for 8 weeks was effective in inducing obesity and associated metabolic changes, such as hyperglycemia, glucose intolerance, dyslipidemia, and hepatic steatosis. The administration of a high-fat diet is a well-established obesity induction model in the literature<sup>(6,19)</sup>, but there is a significant variation in the lipid percentage of these diets. Many studies use high-fat diets composed of 60% fat, which is not representative of the typical western human diet with around 35% fat<sup>(20)</sup>. In this work, we chose to use a diet with 37.9% lipids, very similar to the composition of the human diet.

In addition to the nutritional composition of diets, the chemical composition also influences metabolic responses. The literature shows that a high-fat diet with the addition of palm oil does not induce liver insulin resistance<sup>(21)</sup>, whereas the addition of corn oil, lard, and coconut oil impairs hepatic metabolism<sup>(19)</sup>. Treating animals with a

37.9% fat diet with the addition of lard and soybean oil resulted in hepatic changes with increased areas of steatosis and inflammation (Fig. 4).

After 8 weeks of a high-fat diet, fifty percent of the animals switched to a standard diet, and after 8 weeks of diet replacement, body weight, fat stores, blood glucose, and plasma TG and cholesterol levels were similar to control animals, while glycemic homeostasis and hepatic steatosis were partially normalized in the HFD-CD group compared to the HFD group. It is important to note that despite the dietary intervention with the diet switch, the animals were not subjected to caloric restriction, as the feed was offered *ad libitum*, and surprisingly, we observed that all three groups had the same total caloric intake, although the HFD-CD group lost weight, and the HFD group continued to gain weight until euthanasia. A similar observation was made in the study by Hatzidis *et al.* <sup>(22)</sup>, where they induced obesity with a high-fat diet for 9 weeks and subjected one group of animals to dietary intervention by switching from a high-fat diet to a standard diet for 4 weeks. It was observed that both the animals consuming a high-fat diet and those fed a standard diet had the same caloric intake, despite the weight loss in the dietary intervention group and the maintenance of obesity in the animals fed a high-fat diet.

In our study, we observed that although the total food intake was the same, the HFD-CD and CTL animals consumed approximately 15 kcal/day, while the HFD animals consumed around 17 kcal/day. According to Guo *et al.* <sup>(8)</sup>, significant differences in body weight can be maintained with very small differences in food intake, requiring less than 1 kcal/day more to maintain a higher weight. Moreover, animals subjected to a high-fat diet show lower total energy expenditure due to a decrease in voluntary physical activity <sup>(8, 22)</sup> and hypothalamic inflammation that impairs thermogenesis <sup>(23)</sup> and may stimulate hedonic eating behavior. Interestingly, in the

present study, despite similar food intake during the night and over 24 hours (Fig 3A and B) among the three groups studied, during the daytime, HFD-CD and CTL animals ate less compared to HFD animals (Fig 3C), which could justify the reduction in body weight and fat accumulation, and consequently, improvements in other evaluated parameters. Similar results were observed in HFD mice undergoing vertical gastrectomy (article submitted for publication).

Several studies suggest that the consumption of high-fat diets at certain times of the day can accentuate body weight gain. The timing of food intake is related to the synchronization of various organs involved in the digestion and absorption of nutrients and metabolism, such as the stomach, intestine, and pancreas <sup>(24)</sup>. Animal studies indicate that the timing of food intake influences the synchronization of circadian rhythm genes, and this timing is crucial for weight gain, as well as fat mobilization and body weight reduction <sup>(24)</sup>.

Evidence obtained from animal experimentation shows that eating at the wrong time is closely related to the development of obesity <sup>(25)</sup>. Mice subjected to a high-fat diet during the day, in their resting period, showed greater weight gain despite having a similar total food intake to the control group <sup>(25, 26)</sup>. In this sense, interventions that affect food intake at different times of the day can prevent the development of obesity and its comorbidities.

Moreover, it is known that a high-fat diet could alter eating behavior through changes in the expression of genes that regulate circadian rhythm in the hypothalamus, liver, and adipose tissue. This effect has been associated with changes in insulin, leptin, glucose, and free fatty acid levels <sup>(27)</sup>. These data suggest that a high-fat diet could alter the food consumption of animals during the light/dark cycle through changes in genes that regulate circadian rhythm. In our study, dietary intervention in

the HFD-CD group seems to regulate food consumption during the day, reducing these values and contributing to the observed reduction in body weight.

The body weight loss in the HFD-CD group was accompanied by a significant reduction in both perigonadal and retroperitoneal fat stores, consistent with various experiments involving dietary changes after a period of high-fat diet-induced obesity (22, 28, 29).

Interestingly, despite traditional therapy for obesity recommending caloric restriction and physical exercise, Hatzidis *et al.* (22) observed that mice that switched from a high-fat diet to a standard diet became as lean as control animals, even without exercising, and voluntary running on wheels did not result in additional weight loss, reinforcing the idea that maintaining food intake according to circadian rhythm is crucial in weight gain.

Prolonged consumption of a high-fat diet leads to hyperglycemia and insulin resistance (30). In our study, animals in the HFD-CD group showed a reduction in blood glucose only at some points in the glucose curve (Fig. 2A), with no significant differences in ipITT (Fig. 2D). However, insulin sensitivity inferred through the TyG Index showed that dietary intervention improved insulin sensitivity in HFD-CD animals, partly due to weight loss, considering that in the obese state, macrophages infiltrate target organs and produce inflammatory cytokines that negatively affect insulin signaling and increase chronic inflammation (6).

Our data also showed that after 8 weeks of a high-fat diet, mice had an increase in hepatic area with steatosis and inflammatory foci, an effect that was mitigated after 8 weeks of returning to a standard diet. This effect was similar to that found by Baiges-Gaya *et al.* (29), who observed that switching from a high-fat and carbohydrate-rich diet to a standard diet was effective in reducing lobular inflammation and ballooning of

hepatic cells, typical changes in NAFLD. Siersbæk *et al.* <sup>(7)</sup> also showed that this reversal occurs at both macroscopic and genomic levels. It has also been demonstrated that variations in the expression of circadian rhythm genes are directly related to the development of hepatic steatosis and the development of NAFLD <sup>(31)</sup>. These data suggest that dietary intervention with a standard diet may modulate the expression of genes that regulate circadian rhythm, leading to normalization of food consumption during the daytime and acting, at least in part, to reduce hepatic steatosis levels.

## **CONCLUSION**

In conclusion, replacing a high-fat diet with a normocaloric and balanced diet significantly reduces food intake in animals during the daytime, resulting in the normalization of body weight, fat stores, and plasma lipid profile. It also improves glycemic homeostasis and attenuates hepatic steatosis in mice obese due to a high-fat diet.

## **REFERENCES**

1. Brasil. Ministério Da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2nd ed. Brasília, Df: Ministério Da Saúde; 2014.
2. Fisberg M, Maximino P, Kain J, Kovalskys I. Obesogenic environment – intervention opportunities. *Jornal de Pediatria*. 2016 May;92(3):S30–9.

3. Maija Kallioinen, Sabrina Ionata Granheim, World Health Organization. Regional Office For The Western Pacific. Overweight and obesity in the Western Pacific Region : an equity perspective. Manila, Philippines: World Health Organization, Western Pacific Region; 2017.
4. Nilson EAF, Andrade R da CS, Brito DA de, Michele Lessa de O. Custos Atribuíveis a obesidade, Hipertensão E Diabetes No Sistema Único De Saúde, Brasil, 2018. *Revista Panamericana De Salud Pública* [Internet]. 2020 Apr 10;44(32):1
- 5 World Obesity Federation. World obesity atlas 2023 [Internet]. 2023.
- 6 Li H, Meng Y, He S, Tan X, Zhang Y, Zhang X, et al. Macrophages, Chronic Inflammation, and Insulin Resistance. *Cells*. 2022 Sep 26;11(19):3001.
7. Siersbæk M, Varticovski L, Yang S, Baek S, Nielsen R, Mandrup S, et al. High fat diet-induced changes of mouse hepatic transcription and enhancer activity can be reversed by subsequent weight loss. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2021 May 28];7.
8. Guo X, Yin X, Liu Z, Wang J. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 May 6];23(24):15489.
9. Melby C, Paris H, Foright R, Peth J. Attenuating the Biologic Drive for Weight Regain Following Weight Loss: Must What Goes Down Always Go Back Up? *Nutrients*. 2017 May 6;9(5):468.
10. Cohen R, Pechy F, Petry T, Correa JL, Caravatto PP, Tzanno-Martins C. Bariatric and metabolic surgery and microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2015;37(3).
11. Tahreem A, Rakha A, Rabail R, Nazir A, Socol CT, Maerescu CM, et al. Fad Diets: Facts and Fiction. *Frontiers in Nutrition* [Internet]. 2022 Jul 5;9(9).



12. Montemayor S, García S, Margalida Monserrat-Mesquida, Tur JA, Bouzas C. Dietary Patterns, Foods, and Nutrients to Ameliorate Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Scoping Review. *Nutrients*. 2023 Sep 14;15(18):3987–7.
13. Guerrero-Romero F, Villalobos-Molina R, Jiménez-Flores JR, Simental-Mendia LE, Méndez-Cruz R, Murguía-Romero M, et al. Fasting Triglycerides and Glucose Index as a Diagnostic Test for Insulin Resistance in Young Adults. *Archives of Medical Research*. 2016 Jul;47(5):382–7.
14. Liang W, Menke AL, Driessen A, Koek GH, Lindeman JH, Stoop R, et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. Sookoian SC, editor. *PLoS ONE*. 2014 Dec 23;9(12):e115922.
15. Mendes NF, Velloso LA. Perivascular macrophages in high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. *Journal of Neuroinflammation*. 2022 Jun 9;19(1).
16. Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Jan 3;127(1):24–32.
17. Liu X, Jin Z, Summers S, Derous D, Li M, Li B, et al. Calorie restriction and calorie dilution have different impacts on body fat, metabolism, behavior, and hypothalamic gene expression. *Cell Reports* [Internet]. 2022 May 17 [cited 2022 Dec 9];39(7):110835.
18. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4192–9.
19. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* [Internet]. 2018 Mar 1;14(3):140–62.

20. Stott NL, Marino JS. High Fat Rodent Models of Type 2 Diabetes: From Rodent to Human. *Nutrients*. 2020 Nov 27;12(12):3650.
21. Janneke de Wilde, Smit EF, Mohren R, Boekschoten MV, Philip de Groot, van, et al. An 8-Week High-Fat Diet Induces Obesity and Insulin Resistance with Small Changes in the Muscle Transcriptome of C57BL/6J Mice. *Lifestyle genomics*. 2009 Jan 1;2(6):280–91.
22. Hatzidis A, Hicks JA, Gelineau RR, Arruda N I, De Pina IM, O’Connell KE, et al. Removal of a high-fat diet, but not voluntary exercise, reverses obesity and diabetic-like symptoms in male C57BL/6J mice. *HORMONES*. 2017 May 12;16(1).
23. Arruda AP, Milanski M, Coope A, Torsoni AS, Ropelle E, Carvalho DP, et al. Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis, Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion. *Endocrinology*. 2011 Jan 25;152(4):1314–26.
24. Lopez-Minguez J, Gómez-Abellán P, Garaulet M. Timing of Breakfast, Lunch, and Dinner. Effects on Obesity and Metabolic Risk. *Nutrients* [Internet]. 2019 Nov 1;11(11):2624.
25. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obesity*. 2009 Sep 3;17(11):2100–2.
26. Sherman H, Genzer Y, Cohen R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *The FASEB Journal*. 2012 May 16;26(8):3493–502.
27. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, et al. High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metabolism*. 2007 Nov;6(5):414–21.

28. Parekh PI, Petro AE, Tiller JM, Feinglos MN, Surwit RS. Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism*. 1998 Sep;47(9):1089–96.
29. Baiges-Gayà G, Elisabet Rodríguez-Tomàs, Castañé H, Jiménez-Franco A, Núria Amigó, Camps J, et al. Combining Dietary Intervention with Metformin Treatment Enhances Non-Alcoholic Steatohepatitis Remission in Mice Fed a High-Fat High-Sucrose Diet. *Biomolecules*. 2022 Nov 30;12(12):1787–7.
30. Velázquez KT, Enos RT, Bader JE, Sougiannis AT, Carson MS, Chatzistamou I, et al. Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. *World Journal of Hepatology* [Internet]. 2019 Aug 27;11(8):619–37.
31. Shi D, Chen J, Wang J, Yao J, Huang Y, Zhang G, et al. Circadian Clock Genes in the Metabolism of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Physiology*. 2019 May 8;10.

## **6 CONCLUSÕES GERAIS**

A administração de uma dieta hiperlipídica, por 8 semanas, foi efetiva em induzir a obesidade e alterações metabólicas associadas, como: hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática.

A intervenção dietética, com substituição da dieta hiperlipídica por dieta padrão, reduziu a ingestão alimentar durante o dia, o que culminou em normalização do peso corporal e do perfil lipídico, além de atenuar a esteatose hepática e melhorar a homeostase glicêmica.

## REFERÊNCIAS

ARRUDA, Ana Paula; MILANSKI, Marciane; COOPE, Andressa; *et al.* Low-Grade Hypothalamic Inflammation Leads to Defective Thermogenesis, Insulin Resistance, and Impaired Insulin Secretion. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1314–1326, 2011.

AYDOS, Leonardo R; APARECIDA DO AMARAL, Luane; SERAFIM DE SOUZA, Roberta; *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 3067, 2019.

BAIGES-GAYÀ, Gerard; ELISABET RODRÍGUEZ-TOMÀS; CASTAÑÉ, Helena; *et al.* Combining Dietary Intervention with Metformin Treatment Enhances Non-Alcoholic Steatohepatitis Remission in Mice Fed a High-Fat High-Sucrose Diet. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1787–1787, 2022.

BRASIL. **O impacto da obesidade**. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-quer-ter-peso-saudavel/noticias/2022/o-impacto-da-obesidade#:~:text=O%20resultado%20mostrou%20que%20dos>>. Acesso em: 23 jan. 2024.

\_\_\_\_\_. **Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN**. sisaps.saude.gov.br. Disponível em: <<https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>>. Acesso em: 23 jan. 2024.

\_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília, Df: Ministério Da Saúde, 2014.

CARVALHEIRA, José B.C.; ZECCHIN, Henrique G.; SAAD, Mario J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

COHEN, Ricardo; PECHY, Fernando; PETRY, Tarissa; *et al.* Bariatric and metabolic surgery and microvascular complications of type 2 diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 37, n. 3, 2015.

CUPPARI, Lilian; SCHOR, Nestor; BOTONI, Adriana; *et al.* **Guia de nutrição nutrição clínica no adulto**. [s.l.]: Barueri, Sp Manole, 2019.

ESSER, Nathalie; LEGRAND-POELS, Sylvie; PIETTE, Jacques; *et al.* Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141–150, 2014.

FAHED, Gracia; AOUN, Laurence; BOU ZERDAN, Morgan; *et al.* Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 786, 2022.

FISBERG, Mauro; MAXIMINO, Priscila; KAIN, Juliana; *et al.* Obesogenic environment – intervention opportunities. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. S30–S39, 2016.

FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; NASCIMENTO, André Ferreira do ; CORREA, Camila Renata. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, v. 40, n. 1, p. 81–89, 2015.

GALICIA-GARCIA, Unai. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–34, 2020.

GOITIA, Jesse; CHEN, Aiyu; PATEL, Sej; *et al.* Factors associated with weight gain during the COVID-19 pandemic. **Obesity Research & Clinical Practice**, 2022.

GUERRERO-ROMERO, Fernando; SIMENTAL-MENDÍALuis E.; GONZÁLEZ-ORTIZManuel; *et al.* The Product of Triglycerides and Glucose, a Simple Measure of Insulin Sensitivity. Comparison with the Euglycemic-Hyperinsulinemic Clamp. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347–3351, 2010.

GUO, Xiangyu; YIN, Xunzhe; LIU, Zuoja; *et al.* Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15489, 2022.

GUYTON, Arthur C; HALL, John E. **Guyton & Hall, tratado de fisiología médica**. 14. ed. [s.l.]: Barcelona Elsevier España D.L, 2021.

HATZIDIS, Aikaterini; HICKS, Jasmin A; GELINEAU, Rachel R; *et al.* Removal of a high-fat diet, but not voluntary exercise, reverses obesity and diabetic-like symptoms in male C57BL/6J mice. **HORMONES**, v. 16, n. 1, 2017.

HORVATH, S.; ERHART, W.; BROSCHE, M.; *et al.* Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 43, p. 15538–15543, 2014.

JAIS, Alexander; BRÜNING, Jens C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 24–32, 2017.

JI, Yu; LEE, Hangil; KAURA, Shawn; *et al.* Effect of Bariatric Surgery on Metabolic Diseases and Underlying Mechanisms. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1582, 2021.

JUANOLA, Oriol; MARTÍNEZ-LÓPEZ, Sebastián; FRANCÉS, Rubén; *et al.* Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 10, p. 5227, 2021.

KALWAT, Michael A.; COBB, Melanie H. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the  $\beta$  cell. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 179, p. 17–30, 2017.

KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V.; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021.

KLEINERT, Maximilian; CLEMMENSEN, Christoffer; HOFMANN, Susanna M.; *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 140–162, 2018.

KOHSAKA, Akira; LAPOSKY, Aaron D.; RAMSEY, Kathryn Moynihan; *et al.* High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 414–421, 2007.

KOMATSU, Mitsuhsisa; TAKEI, Masahiro; ISHII, Hiroaki; *et al.* Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, n. 6, p. 511–516, 2013.

LI, He; MENG, Ya; HE, Shuwang; *et al.* Macrophages, Chronic Inflammation, and Insulin Resistance. **Cells**, v. 11, n. 19, p. 3001, 2022.

LIANG, Wen; MENKE, Aswin L.; DRIESSEN, Ann; *et al.* Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115922, 2014.

MACLEAN, P. S.; HIGGINS, J. A.; GILES, E. D.; *et al.* The role for adipose tissue in weight regain after weight loss. **Obesity Reviews**, v. 16, p. 45–54, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4371661/>>.

MAHAN; ESCOTT-STUMP, Sylvia ; ANDRÉA FAVANO. **Krause : alimentos, nutrição & dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2005.

MANCINI, Marcio. **Tratado de obesidade** . Rio de Janeiro: Guanabara, 2020.

MARCELINO, Liete Francisco ; PATRÍCIO, Zuleica Maria. A complexidade da obesidade e o processo de viver após a cirurgia bariátrica: uma questão de saúde coletiva. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 12, p. 4767–4776, 2011.

MARZZOCO, Anita ; BAYARDO BAPTISTA TORRES. **Bioquímica básica**. Rio De Janeiro (Rj): Guanabara Koogan, 2007.

MELBY, Christopher; PARIS, Hunter; FORIGHT, Rebecca; *et al.* Attenuating the Biologic Drive for Weight Regain Following Weight Loss: Must What Goes Down Always Go Back Up? **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 468, 2017.

MENDES, Natalia F. ; VELLOSO, Licio A. Perivascular macrophages in high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, 2022.

MOREIRA, Gabriela Virginia. **Liraglutida promove mudança da microbiota intestinal com redução da massa adiposae da esteatose hepática não-alcoólica**

**em dois modelos animais de obesidade.** Dissertação, Universidade de São Paulo (USP), 2017.

MORENO-FERNÁNDEZ, Silvia; GARCÉS-RIMÓN, Marta; VERA, Gema; *et al.* High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1502, 2018.

MUSSO, Giovanni; GAMBINO, Roberto; DE MICHIELI, Franco; *et al.* Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 4, p. 909–916, 2003.

NILSON, Eduardo Augusto Fernandes; ANDRADE, Rafaella da Costa Santin; BRITO, Daniela Aquino de; *et al.* Custos Atribuíveis a obesidade, Hipertensão E Diabetes No Sistema Único De Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana De Salud Pública**, v. 44, n. 32, p. 1, 2020.

PAREKH, Priti I.; PETRO, Ann E.; TILLER, Jane M.; *et al.* Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 47, n. 9, p. 1089–1096, 1998.

POUWELS, Sjaak; SAKRAN, Nasser; GRAHAM, Yitka; *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. **BMC Endocrine Disorders**, v. 22, n. 1, 2022.

RABACOW, Fabiana M.; AZEREDO, Catarina M. ; REZENDE, Leandro F.M. Deaths Attributable to High Body Mass in Brazil. **Preventing Chronic Disease**, v. 16, 2019.

ROSE, Kelsey L.; EVANS, E. Whitney; SONNEVILLE, Kendrin R.; *et al.* The set point. **Current Opinion in Pediatrics**, v. Publish Ahead of Print, 2021.

RUSSO, Sara; KWIATKOWSKI, Marcel; GOVORUKHINA, Natalia; *et al.* Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

SIERSBÆK, Majken; VARTICOVSKI, Lyuba; YANG, Shutong; *et al.* High fat diet-induced changes of mouse hepatic transcription and enhancer activity can be reversed by subsequent weight loss. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

SOUZA, Cláudio T.; ARAUJO, Eliana P.; BORDIN, Silvana; *et al.* Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005.

STOTT, Nicole L. ; MARINO, Joseph S. High Fat Rodent Models of Type 2 Diabetes: From Rodent to Human. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3650, 2020.

TAHREEM, Aaiza; RAKHA, Allah; RABAIL, Roshina; *et al.* Fad Diets: Facts and Fiction. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. 9, 2022.



THALER, Joshua P.; YI, Chun-Xia; SCHUR, Ellen A.; *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153–162, 2012.

TORDOFF, Michael G. ; ELLIS, Hillary T. Obesity in C57BL/6J mice fed diets differing in carbohydrate and fat but not energy content. **Physiology & Behavior**, v. 243, p. 113644, 2022.

TOSHIMITSU, Kumiko; MATSUURA, Bunzo; OHKUBO, Ikuko; *et al.* Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 23, n. 1, p. 46–52, 2007.

TREFTS, Elijah; GANNON, Maureen ; WASSERMAN, David H. The liver. **Current Biology**, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2017.

VELÁZQUEZ, Kandy T; ENOS, Reilly T; BADER, Jackie E; *et al.* Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. **World Journal of Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 619–637, 2019.

VELLOSO, Lício A.; ARAÚJO, Eliana P. ; DE SOUZA, Cláudio T. Diet-Induced Inflammation of the Hypothalamus in Obesity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 189–193, 2008.

WAISE; TAKEHIKO KOJI; FARHANA NAZNIN; *et al.* One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 464, n. 4, p. 1157–1162, 2015.

WHO. **Overweight and obesity in the Western Pacific Region : an equity perspective**. Manila, Philippines: World Health Organization, Western Pacific Region, 2017.

WILDE; SMIT, Egbert F; MOHREN, Ronny; *et al.* An 8-Week High-Fat Diet Induces Obesity and Insulin Resistance with Small Changes in the Muscle Transcriptome of C57BL/6J Mice. **Lifestyle genomics**, v. 2, n. 6, p. 280–291, 2009.

WOF. **World obesity atlas 2023**. [s.l.: s.n.], 2023. Disponível em: <<https://data.worldobesity.org/publications/WOF-Obesity-Atlas-V5.pdf>>.

XU, Xiaohan; POULSEN, Kyle L.; WU, Lijuan; *et al.* Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH). **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

YANG, Zhi-Hong; INOUE, Seika; TANIGUCHI, Yasuko; *et al.* Long-term dietary supplementation with saury oil attenuates metabolic abnormalities in mice fed a high-fat diet: combined beneficial effect of omega-3 fatty acids and long-chain monounsaturated fatty acids. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, 2015

## ANEXO 1

### Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais



#### Autorização

O Protocolo nº 22-20 intitulado “**Avaliação dos parâmetros metabólicos em camundongos obesos por dieta hiperlipídica submetidos a vagotomia total subdiafragmática e a vagotomia celiaca**”, sob a responsabilidade de **Sandra Lucinei Balbo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 05/03/2021. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/04/2021 a 04/04/2024
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico - C57BL/6
N. de animais	120
Peso/Idade	20-22g - 45 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Unioeste

Cascavel, 08/03/2021

**Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña**  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 3126/2018-GRE

## ANEXO 2

### Normas da Revista

#### Revista Einstein

##### Requerimentos técnicos

Os autores deverão submeter os artigos contendo:

- Texto digitado em fonte Arial 12, espaço duplo, margem de 2,5 cm de cada lado, destacando cada seção do artigo.
- Declaração dos autores de que o manuscrito não está sob apreciação e não será submetido para publicação em outro periódico (disponível no sistema eletrônico de submissão).
- Os estudos realizados que requerem aprovação do comitê de ética em seres humanos ou animais devem incluir na seção de métodos o número de aprovação apropriado do comitê de ética. Por exemplo, estudos em seres humanos realizados no Brasil devem incluir o número CAAE.
- Declaração de divulgação de conflitos de interesse de cada autor.

##### Título

Título do artigo, em inglês, que deve ser conciso mas informativo.

##### Resumo

Resumo, em inglês, limitado a **250 palavras**. Para artigos originais, os resumos devem ser estruturados (Objetivo, Métodos, Resultados, Conclusão), descrever as principais partes do trabalho e destacar os dados mais relevantes. Para artigos de outras seções o resumo não deverá ser estruturado.

## **Palavras-chave**

Forneça no mínimo 5 e no máximo 10 palavras-chave, em inglês, que reflitam o conteúdo do artigo. As palavras-chave devem ser baseadas no Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/>

## **Texto**

O texto deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. As citações de autores no texto devem ser numeradas sequencialmente, por algarismos arábicos sobrescritos entre parênteses. A definição completa das abreviaturas e siglas deverá ser escrita antes de seu primeiro uso no texto. Não utilizar abreviaturas ou siglas no título e no resumo. Nas legendas de tabelas e figuras, as abreviaturas devem ser seguidas do termo completo.

## **Reconhecimentos**

Isto descreve a colaboração de indivíduos que merecem reconhecimento, mas não se qualificam para autoria. Esta seção também deve ser usada para fornecer informações sobre suporte financeiro e/ou técnico, etc.

## **Referências**

Devem ser numerados consecutivamente na mesma ordem em que aparecem no texto e identificados por algarismos arábicos. As referências seguem o “Estilo Vancouver”, e os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela List of Journals Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>. Para quaisquer referências, mencionar até seis autores. No caso de mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos de et al.

## **Tabelas**

Todas as tabelas (**≤ 4 tabelas**) deverão conter título e cabeçalho das colunas e deverão ser mencionadas no texto. Deverão ser numerados sequencialmente por algarismos arábicos, na ordem em que aparecem no texto. As notas de rodapé das tabelas devem conter a definição das abreviaturas e dos testes estatísticos utilizados.

## **Figuras**

Qualquer figura (imagens, gráficos, fotografias e ilustrações) deverá ser mencionada no texto e apresentada em tamanho maior ou igual ao pretendido. **A revista não aceita mais de quatro figuras por artigo.** Deverão ser numerados sequencialmente por algarismos arábicos, na ordem em que aparecem no texto. Caso as figuras já tenham sido publicadas, deverá ser fornecida autorização por escrito para reprodução pelo autor/editor, e as legendas deverão incluir a fonte de publicação.

## ANEXO 3

### DECLARAÇÃO DE REVISÃO

Eu, Evely Solange Carai Monteiro, portadora da carteira de identidade de número 8.562.375-1, inscrita no CPF sob o número 046.889.398-92, pós-graduada em Língua Portuguesa e Literatura no Contexto Educacional pelo Centro Universitário Internacional UNINTER, em 29 de agosto de 2022, declaro que realizei a revisão da dissertação de Mestrado em Biociências e Saúde, intitulada **Efeitos da Substituição da Dieta Hiperlipídica pela Dieta Padrão sobre a Homeostase Glicêmica e Esteatose Hepática em Camundongos**, defendida pela aluna Vanessa Cristina de Souza Melo no Programa de Mestrado da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Declaro que a revisão realizada contemplou três conjuntos de características, a saber: a) adequação linguística-textual, gramatical e ortográfica da norma culta da Língua Portuguesa; b) padrões de formatação utilizados pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE); c) itens normativos apresentados nas normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) a destacar: referências; numeração progressiva das seções; resumo; *abstract*; sumário; siglas; citações no documento (autores, figuras, quadros, tabelas) e demais aspectos que caracterizem qualidade esperada em um trabalho acadêmico-científico.

São Paulo, 28 de março de 2024.

EVELY SOLANGE CARAI MONTEIRO

Evely Solange Carai Monteiro