

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

**INSTALAÇÃO PRECOCE E PROGRESSÃO DE DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS JOVENS COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

São Luís

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

**INSTALAÇÃO PRECOCE E PROGRESSÃO DE DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS JOVENS COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

Artigo apresentado à Banca Examinadora da  
Universidade Federal do Maranhão como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
bacharel em Medicina, sob a orientação do  
Professor Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes.

São Luís

2017

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

**INSTALAÇÃO PRECOCE E PROGRESSÃO DE DOENÇA HEPÁTICA  
GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS JOVENS COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

São Luís, \_\_\_\_\_ de Setembro de 2017

---

Professor Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)

---

Professora Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira (1ª Examinadora)

---

Professora Msc. Karla Frida Torres Flister (2ª Examinadora)

---

Rogério Soares Castro (3º Examinador)

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, ou qualquer que seja o nome desta força criadora de tudo, causa primeira de todas as coisas, soberanamente justo e bom.

Agradeço aos meus pais, que sempre fizeram o máximo para que pudesse ter uma boa educação, e me ensinaram a sensibilidade para todos os meus gostos e gestos. Agradecer especialmente à minha mãe, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, em todas as minhas crises existenciais e todas as decisões que tenho ou tive de tomar; por termos superado juntos tantas barreiras (e ainda há tantas outras que superar); por ter sido minha melhor amiga e companheira.

Quero agradecer ao meu irmão Gabriel, meu melhor amigo, aquele que desde pequeno desbravou a ciência comigo, em nosso desejo infantil de sempre conseguir explicações para a diversidade de vida existente.

Quero agradecer ao meu orientador, Antonio Marcus, que desde o meu segundo período da graduação tem sido aquele quem me fez dar os primeiros passos científicos, quem me inspira na qualidade de professor e pesquisador, e tem se tornado amigo e conselheiro.

Quero agradecer a meus familiares, pois ajudaram a formar aquilo que sou. Agradeço à minha avó Rita, por sempre me acolher; aos meus primos, que sempre foram meus outros irmãos (Italo, que sempre dá apoio e motivação, Aline, Priscila, Dudu, Igor e Enzo), pela convivência e pelo carinho; à minha avó Terezinha, por estar sempre à frente de seu tempo, e do nosso; e aos meus tios (Francisca, a tia que me acode nos momentos de desespero e mais me auxiliou na minha jornada neste curso, Cláudia, minha madrinha companheira, Kláuber, o tio engraçado, Jéssica, a tia-prima-irmã-amiga, Lílian e Liliane, as tias mais novas com quem sempre aprendo, Zé Filho, Christiane, a tia coruja).

Quero agradecer aos meus amigos, pois eles tornam minha existência mais leve, sem, no entanto, deixá-la banal ou infrutífera. A Fernanda e Gabriela, as mais antigas; a Nilson, Juliana, Imaíra e Otília, os amigos de poesia e música; a Mariana Reis, a amiga meiga; a Mariana Castro e Carlos André, amigos desde o terceiro ano do Ensino Médio; Deysielle e Rodrigo, meus amigos filósofos; a Arthur e Thaís, meus amigos criativos. E a todos aqueles não citados, porque as letras são limitadas.

Quero agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho. Às professoras Flávia Nascimento e Ana Paula Azevedo, que me ajudaram a discutir alguns dos dados apresentados e, além disso, ajudaram na minha formação durante a graduação e durante minha participação na monitoria de Bioquímica. A toda equipe do Laboratório de Fisiologia, meu querido Lefisio – onde passei e passo os melhores momentos da minha graduação –, por ter me auxiliado nos experimentos.

Quero agradecer à minha amada turma 93 de Medicina da UFMA, minha antiga turma, onde convivi com os médicos mais incríveis, humanos e inteligentes que já conheci. Quero agradecer à turma 95, por ter me acolhido em meu retorno do Ciências Sem Fronteiras, por ser uma turma de mentes inquietas, questionadoras e críticas.

Quero, por fim, agradecer aos membros da banca examinadora que prontamente aceitaram tarefa de analisar, criticar e avaliar este trabalho.

“Eu retirava das coisas a ilusão que elas produzem para se preservarem de nós e lhes deixava a parte que elas nos concedem” (René Char)

## **Resumo**

Contextualização e objetivos: A obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG) em camundongos é um modelo muito usado em estudos de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Contudo, não há muitos dados na literatura sobre seu início e sua progressão. Destarte, este estudo objetivou caracterizar o início dos aspectos metabólicos e histopatológicos da DHGNA, bem como sua progressão para Esteato-hepatite Não Alcoólica (EHNA) neste modelo. Métodos: Camundongos da linhagem Swiss tratados no período neonatal com MSG (4 g/Kg/dia, S.C.) ou solução salina equiosmolar e foram acompanhados por 60, 120 ou 180 dias de vida. Em cada idade, sangue, fígado, bem como gorduras retroabdominal e periepídimal foram coletados para análise morfométrica, bioquímica e histopatológica, esta última segundo o Escore da Atividade da DHGNA. Resultados: Camundongos MSG apresentaram hipertrigliceridemia e obesidade central em todas as idades, mas a resistência insulínica foi verificada apenas com 120 e 180 dias de vida. Os teores hepáticos de gorduras totais e de triglicerídeos foram maiores em camundongos MSG em todas as idades. Nesse sentido, a análise histopatológica mostrou que os camundongos MSG com 60 dias de vida tiveram esteatose microvesicular com rara degeneração globosa, que evoluiu para EHNA aos 120 dias. O acúmulo de gordura retroperitoneal foi a púnica variável independentemente correlacionada com a pontuação total do Escore da Atividade da DHGNA ( $R\text{-quadrado} = 71,25\%$ ). Não houve diferença na concentração sérica de IL-6 e TNF- $\alpha$  entre os grupos. Conclusões: DHGNA é um desfecho precoce em camundongos com obesidade MSG, enquanto o período compreendido entre 60 e 120 dias constitui um intervalo crucial para os eventos fisiopatológicos envolvidos na progressão DHGNA-EHNA neste modelo.

## **Abstract**

**Background and Aim:** Monosodium L-glutamate(MSG)-induced obesity is a useful model for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) studies. However, there is limited data on its initiation and progression. Thus, this study aimed to characterize the onset of metabolic and histopathological features of NAFLD and its progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in this model. **Methods:** Swiss mice pups were neonatally injected with MSG (4 g/Kg/day, s.c.) or equiosmolar saline and followed up to 60, 120 or 180 days old. At each age, blood, liver, as well as periepididymal and retroperitoneal fat pads were collected for morphometric, biochemical and histological analyses, the later according to NAFLD Activity Score. **Results:** MSG mice presented hypertriglyceridemia and central obesity at all ages, but insulin-resistance was verified only in 120- and 180-day-old mice. Hepatic total fat and triglycerides content were higher in MSG mice at all ages. Accordingly, histopathological analysis showed that 60-day-old MSG mice had microvesicular steatosis with rare ballooning, which evolved into NASH from 120 days old. Retroperitoneal fat accumulation was the only variable to independently correlate with NAFLD activity total score upon multivariate analysis ( $R^2 = 71,45\%$ ). There were no differences in IL-6 and TNF- $\alpha$  serum levels among groups. **Conclusions:** NAFLD is a precocious outcome in MSG-obese mice, whereas the period comprised between 60 and 120 days old constitutes a crucial window for physiopathological events involved in NAFLD-to-NASH progression in this model.



## Sumário

|   |    |
|---|----|
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....   | 10 |
| 1.0 INTRODUÇÃO .....  | 11 |
| 2.0 MÉTODOS .....   | 12 |
| 2.1 Tratamento neonatal com MSG e avaliação da obesidade .....                              | 12 |
| 2.2 Bioquímica e resistência à insulina por Índice TyG.....                                 | 12 |
| 2.3 Concentração sérica de citocinas por citometria de fluxo .....                          | 13 |
| 2.4 Análise do perfil lipídico hepático .....   | 13 |
| 2.5 Análise histopatológica do fígado .....   | 13 |
| 2.6 Análise estatística.....  | 13 |
| 3.0 RESULTADOS.....   | 14 |
| 3.1 Período de desenvolvimento de Síndrome Metabólica no grupo MSG .....                    | 14 |
| 3.2 Acúmulo de gordura hepática e progressão de DHGNA para EHNA em camundongos<br>MSG ..... | 15 |
| 4.0 DISCUSSÃO.....  | 15 |
| REFERÊNCIAS .....   | 19 |
| TABELAS.....  | 24 |
| LEGENDAS.....   | 26 |
| ANEXOS.....   | 28 |

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

Este artigo foi submetido ao *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (regras de submissão e comprovante de submissão em anexo). A formatação do artigo, a disposição de seus elementos textuais e não textuais e o padrão de referenciamento utilizado (Vancouver) estão, portanto, conforme as regras para submissão de artigos originais disponíveis na página online da revista. A tradução do artigo pode não ter preservado, contudo, o número mínimo de palavras exigido pela revista para artigos originais.

## 1.0 INTRODUÇÃO

A Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA), definida como o acúmulo citoplasmático de lipídeos dentro dos hepatócitos na ausência de consumo relevante de álcool<sup>(1)</sup>, tem sido considerada a principal manifestação hepática da Síndrome Metabólica, e sua prevalência atingiu níveis epidêmicos no mundo<sup>(2)</sup>. Sob injúria prolongada, os hepatócitos começam a liberar citocinas pró-inflamatórias que levam à infiltração macrofágica e a progressão da doença para Esteato-hepatite Não-Alcoólica (EHNA)<sup>(3)</sup>. Os critérios histopatológicos de EHNA incluem a presença mandatória de esteatose, balonização e inflamação lobular, com ou sem fibrose perisinusoidal em zona 3<sup>(4)</sup>. Outras lesões, tais como microgranulomas, lipogranulomas, megamitocôndrias, corpos de Mallory e núcleos glicogenados constituem achados adicionais úteis para diagnóstico diferencial<sup>(5)</sup>.

A progressão de DHGNA para EHNA pode ser explicada pela “Teoria dos Dois Danos”, onde o primeiro dano corresponde à esteatose e o segundo ao conjunto estresse oxidativo/síntese de citocinas<sup>(3)</sup>. Entretanto, os mecanismos fisiopatológicos implicados nesse processo ainda são pouco compreendidos, enquanto que os modelos animais disponíveis não conseguem apresentar todos os achados da DHGNA/EHNA<sup>(6)</sup>. Um modelo animal ideal deve preencher dois critérios básicos: padrão histopatológico similar à DHGNA humana e a instalação de esteato-hepatite sob um contexto metabólico disfuncional<sup>(7)</sup>. Roedores alimentados com uma dieta deficiente em metionina e colina desenvolvem DHGNA/EHNA semelhantes à humana, porém não exibem o estado metabólico de instalação; enquanto roedores tratados com uma dieta rica em gordura apresentam todos os parâmetros metabólicos, mas não progridem em severidade histopatológica de doença<sup>(8)</sup>. Por outro lado, camundongos com deficiência de leptina (*ob/ob*), um modelo genético amplamente estudado que desenvolve naturalmente DHGNA, não progride para EHNA por conta das baixas concentrações séricas de leptina<sup>(7)</sup>.

Injeção neonatal de L-glutamato monossódico (MSG) causa danos em núcleos hipotalâmicos, como o núcleo arqueado<sup>(9, 10)</sup>, levando à deficiente secreção de hormônio do crescimento (GH, *growth hormone*, em inglês), bem como o desbalanço autonômico caracterizado pela diminuição do tônus simpático e elevado tônus parassimpático<sup>(11-13)</sup>. Roedores com obesidade MSG têm Síndrome Metabólica, uma vez que apresentam obesidade central, dislipidemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e diabetes mellitus tipo II<sup>(14-17)</sup>. Em um trabalho prévio, nosso grupo mostrou que ratos MSG com 16 semanas de vida tinham DHGNA associada à hipertrigliceridemia<sup>(18)</sup>. Além disso, já é

bem documentado que camundongos MSG com 24 semanas de vida adquiriram EHNA aguda com achados histopatológicos semelhantes aos do humano<sup>(19)</sup>. Todavia, a análise da progressão da doença em camundongos DIAR tratados com MSG mostrou que eles apresentaram EHNA com 29 semanas de vida, que evoluiu para cirrose em torno das 54 semanas<sup>(15)</sup>. Outros estudos também descreveram o desenvolvimento de DHGNA para EHNA em camundongos MSG, mas utilizando animais adultos velhos<sup>(19, 20)</sup>.

Embora a obesidade induzida por MSG seja um modelo bem estabelecido para DHGN/EHNA<sup>(15, 19, 20)</sup>, sendo aplicável para teste pré-clínicos de drogas ou extratos de plantas hipolipemiantes<sup>(21-24)</sup>, a literatura ainda é incipiente sobre seu início em idades mais jovens. Desse modo, neste estudo pretendemos caracterizar a instalação da DHGNA em camundongos MSG e sua evolução em EHNA na idade adulta, explorando os achados metabólicos e histopatológicos em três idades distintas.

## **2.0 MÉTODOS**

### **2.1 Tratamento neonatal com MSG e avaliação da obesidade**

Filhotes machos (n=18) de camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) foram tratados com 4g/Kg/dia de MSG (MSG, Sigma Aldrich, EUA) por via subcutânea em dias alternados durante 10 dias de vida. Animais controle (CTR, n = 19) foram tratados com um volume similar de solução salina equiosmolar. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Eles foram mantidos a uma temperatura de  $23 \pm 2$  °C, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com oferta de água e comida *ad libitum*. Além disso, foram pesados duas vezes por semana para acompanhamento do ganho de peso, e, a cada 30 dias de vida, foi determinado o Índice de Lee, que é calculado dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal(cm)<sup>(24)</sup>. Grupos MSG e CTR foram divididos em três subgrupos de acordo com a idade de eutanásia: 60, 120, e 180 dias (CTR/MSG<sub>60,120,180</sub>).

Nas idades predeterminadas, depois de uma noite em jejum, os animais foram anestesiados (10 mg/kg de xilazina, 40 mg/kg de cetamina), pesados para análise morfométrica e submetidos à laparotomia para coleta de gorduras periepididimal e retroperitoneal (GPE e GRP, respectivamente), e fígado. Sangue foi coletado por punção do seio retro-orbitário. Todos os protocolos foram feitos de acordo com guidelines internacionais de bem-estar animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão no.001/2009.

### **2.2 Bioquímica e resistência à insulina por Índice TyG**

Amostras de sangue foram coaguladas e centrifugadas para separação do soro. Os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos (TG) e glicose foram analisados

através de espectrofotometria com auxílio de kits da Labtest (Labtest, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A resistência insulínica foi avaliada pelo Índice TyG, obtido pela seguinte fórmula:  $Ln[\text{trigliceridemia de jejum (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)/2}]^{(25)}$ .

### 2.3 Concentração sérica de citocinas por citometria de fluxo

Nós analisamos a concentração sérica de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) pela técnica *Cytometric Bead Assay*. Todos os reagentes utilizados foram obtidos do *Mouse Inflammation Kit* (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA). Depois de ler as amostras em um citômetro de fluxo, os dados foram analisados pelo programa FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA), onde foram expressos em pg/mL para cada citocina.

### 2.4 Análise do perfil lipídico hepático

Amostras de fígado foram homogeneizadas em uma solução de clorofórmio/metanol (2/1, v/v). O homogenato descansou durante a noite e, no dia seguinte, foi filtrado com papel filtro comum. Solução salina 0,9% foi adicionada à solução final (1/5, v/v), e o conteúdo final foi misturado por inversão. Depois de duas horas em repouso, o conteúdo final foi centrifugado (1000 rpm, 5min). A fase aquosa foi descartada e a outra secada placa de Petri. Em seguida, a quantidade total de gordura em cada amostra foi calculada. A gordura total foi ressuspensa em 1 mL de Triton X-100/metanol (2/1, v/v) para dosagem de TG e CT pelo mesmo método descrito em “Bioquímica e resistência insulínica por Índice TyG”.

### 2.5 Análise histopatológica do fígado

Amostras de tecido hepático foram fixadas em solução de tampão fosfato de paraformaldeído 10% e analisadas pela microscopia óptica após coloração com hematoxilina-eosina (HE) ou Tricromo de Masson. O Escore de Atividade de DHGNA (EAD) foi aplicado durante a análise. Este escore foi validado por Kleiner et al.<sup>(26)</sup> e é baseado em uma análise semi-quantitativa dos três critérios de EHNA: esteatose (0-3), balonização (0-3), e inflamação lobular (0-2). O escore total é um valor de 0 a 8 que indica o prognóstico do fígado animal/humano. Escores maiores que 6 indicam EHNA; de 3 a 5, borderline (podem ser ou não ser EHNA); e de 0 a 2, é não EHNA. Além disso, há um escore para fibrose, de 0 a 4, que não é considerado para o cálculo do valor de pontuação total<sup>(26)</sup>.

### 2.6 Análise estatística

Os grupos CTR e MSG foram comparados usando teste-t de Student, enquanto os subgrupos de MSG ou CTR entre si foram comparados por ANOVA com pós-teste

de Newman-Keuls. O nível de insignificância estabelecida foi de  $p < 0.05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (exceto as citocinas, expressas como mediana) e analisadas usando o software Prism 5 (GraphPad, EUA). Análise multivariada foi realizada através do software Stata 14 (StataCorp, USA) para avaliar a variável independentemente relacionada ao valor total de EAD entre as que se seguem<sup>(27)</sup>: grupo, idade, TG, glicemia de jejum, GPE, GRP, Índice de Lee, concentração hepática de triglicerídeos, gordura total no fígado.

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 Período de desenvolvimento de Síndrome Metabólica no grupo MSG

Camundongos MSG<sub>60</sub> pesaram menos que os CTR<sub>60</sub>, porém tinham estoques de GPE e GRP até duas vezes mais pesados; a obesidade também pôde ser caracterizada pelo elevado valor de Índice de Lee (Tabela 1). Como mostrado nas Figuras 1A e 1B, camundongos MSG<sub>60</sub> apresentaram maiores níveis séricos de TG ( $50.86 \pm 10.75$  mg/dL) e colesterol total ( $127.7 \pm 5.8$  mg/dL) quando comparado ao CTR<sub>60</sub> ( $30.45 \pm 2.74$  mg/dL e  $93.33 \pm 3.27$  mg/dL, respectivamente),  $p < 0.05$ . Por outro lado, MSG<sub>60</sub> era hipoglicêmico ( $90.0 \pm 5.9$  mg/dL) em comparação ao CTR<sub>60</sub> ( $160.0 \pm 8.5$  mg/dL),  $p < 0.05$  (Figura 1C). O cálculo do Índice TyG para ambos os grupos não sugeriu menor sensibilidade à insulina para os camundongos MSG<sub>60</sub> (Figura 1D), o que indica que a esta idade os camundongos MSG eram obesos, mas não apresentavam Síndrome Metabólica.

A análise dos parâmetros mencionados acima mostrou que o ganho de peso pelos camundongos MSG foi acelerado, uma vez que o peso dos animais MSG<sub>120</sub> não diferiu do CTR<sub>120</sub>, mas o dos MSG<sub>180</sub> tornou-se mais elevado (Tabela 1). Uma aceleração similar foi observada nos níveis de glicemia, que era menor no grupo MSG<sub>60</sub>, mas elevou-se tanto no grupo MSG<sub>120</sub> ( $214.9 \pm 27.2$  mg/dL) quanto no MSG<sub>180</sub> ( $195.8 \pm 23.6$  mg/dL) em comparação aos seus controles (CTR<sub>120</sub>:  $150.6 \pm 14.1$  mg/dL; CTR<sub>180</sub>:  $113.9 \pm 17.1$  mg/dL). Além da glicemia, o TG atingiu níveis duas vezes maiores que seus controles tanto aos 120 quanto aos 180 dias de vida (Figura 1B), enquanto os níveis de colesterol total não mostraram diferença entre os grupos (Figura 1C). Da mesma forma, o Índice TyG foi elevado significativamente nessas duas idades (Figura 1D), que junto dos valores elevados de Índice de Lee (Tabela 1) evidenciam a progressão das disfunções metabólicas dos camundongos MSG para o estabelecimento da Síndrome Metabólica, visto que eram obesos e tornaram-se hiperglicêmicos, hipertrigliceridêmicos e resistentes à insulina.

### **3.2 Acúmulo de gordura hepática e progressão de DHGNA para EHNA em camundongos MSG**

Os fígados dos camundongos controle são mais pesados que os dos animais MSG em todas as idades (Tabela 1), enquanto os últimos apresentaram maior acúmulo de gordura total hepática em todas as idades (Figura 2C). O conteúdo hepático de TG foi significativamente elevado nas idades avaliadas, atingindo valores quatro vezes maiores que os controles aos 180 dias de vida (CTR<sub>180</sub>: 31,1 ± 5,5 mg/g de fígado e MSG<sub>180</sub>: 126.6 ± 15.7 mg/g de fígado), p<0.05 (Figura 2A). Surpreendentemente, os níveis de colesterol total hepático não foram diferentes entre os grupos, mas mostraram uma elevação paralela dependente da idade em ambos os grupos (Figura 2B).

Análise do escore de atividade do DHGNA mostrou que MSG<sub>60</sub> já apresentava DHGNA, caracterizada por esteatose microvesicular e balonização celular ocasional (Figura 3). No grupo MSG<sub>120</sub>, as lâminas hepáticas evidenciaram focos inflamatórios de polimorfonucleares: neutrófilos e macrófagos, além de esteatose microvesicular com mais balonização, de forma que a doença hepática evoluísse para EHNA (Figure 4). MSG<sub>180</sub> apresentou EHNA mais agravada, com uma pontuação para esteatose duas vezes maior (Figura 4) e outros achados histopatológicos, como microgranulomas e núcleos glicogenados (Figuras 5A e 5B). Entretanto, fibrose não foi observada nem no MSG<sub>120</sub> nem no MSG<sub>180</sub> (Figuras 5C e 5D, respectivamente). A análise multivariada foi realizada para analisar qual variável metabólica ou morfométrica foi correlacionada à pontuação total do EAD em cada grupo. R-quadrado para esta análise foi maior que 70%, que mostrou que a GRP foi a única variável independentemente correlacionada com a progressão de DHGNA para EHNA em camundongos com obesidade MSG (Tabela 2).

## **4.0 DISCUSSÃO**

Há muitos modelos genéticos e dietéticos descritos na literatura para o estudo da DHGNA, mas poucos mostram a repercussão inflamatória associada à progressão para EHNA ou achados histopatológicos semelhantes aos da doença em seres humanos<sup>(28)</sup>. No presente estudo, mostramos que camundongos com obesidade MSG desenvolveram DHGNA precocemente, que progrediu para EHNA, de acordo com um seguimento do curso da doença consistente com a Teoria dos Dois Danos<sup>(3)</sup>. Nossos camundongos MSG apresentaram esteatose na jovem idade de 60 dias, evoluindo para resistência insulínica hepática e inflamação na fase adulta (120 e 180 dias de idade), em oposição a outros estudos que mostraram desenvolvimento de DHGNA em idades mais avançadas neste modelo animal<sup>(15, 20)</sup>.

A lesão hipotalâmica consequente da administração neonatal de MSG induz hiperatividade do nervo vago levando à hiperinsulinemia precoce<sup>(29, 30)</sup>, que não é necessariamente concomitante à hiperglicemia<sup>(30-32)</sup>. Camundongos MSG<sub>60</sub> apresentaram glicemia de jejum menor que CTR<sub>60</sub>, sugerindo maior captação periférica de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina. Por outro lado, MSG<sub>60</sub> mostrou níveis séricos de TG em jejum duas vezes superiores, achado este consistente com maior exportação de TG do fígado. Em um artigo prévio, nosso grupo mostrou que a hipertrigliceridemia evidenciada por ratos com obesidade MSG foi relacionada a menor sensibilidade hepática à insulina, levando à maior expressão da isoforma da proteína microsomal transportadora de TG (MTP), uma enzima envolvida na produção e secreção dependente de insulina das partículas de VLDL<sup>(18)</sup>. Contudo, a análise do Índice TyG em nossos animais com 60 dias de vida não mostraram diferença entre MSG e CTR, sugerindo uma sensibilidade à insulina ainda preservada no fígado dos camundongos MSG<sub>60</sub>.

Apesar dos achados acima mencionados, MSG<sub>60</sub> apresentou elevado acúmulo de gordura hepática, principalmente caracterizada pelo aumento do conteúdo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos, que resultou em esteatose microvesicular em zona 3. Este estabelecimento precoce de DHGNA é claramente resultado do aumento do estoque de TG. Em pacientes com DHGNA, é descrito que 59% do TG dentro dos hepatócitos provêm dos lipídeos circulantes, enquanto 26% se originam da lipogênese *de novo*<sup>(33)</sup>. Muito embora não tenhamos avaliado vias lipogênicas neste estudo, é possível sugerir que tal acúmulo de lipídeos é associado à ativação da resposta à proteína mal-enovelada, como publicado anteriormente por nosso grupo<sup>(18)</sup>, uma vez que o cálculo do Índice TyG não sustenta diminuição da sensibilidade à insulina no fígado do grupo MSG<sub>60</sub>. Contudo, também é sabido que ácidos graxos livres regulam a síntese de TG hepático através de uma via independente da insulina<sup>(34)</sup>, que também contribui para o desenvolvimento precoce de DHGNA.

Aos 120 dias de vida, os camundongos MSG exibiram hiperglicemia de jejum, hipertrigliceridemia e obesidade central, preenchendo os critérios para Síndrome Metabólica. De fato, MSG<sub>120</sub> apresentou aumento do Índice TyG, enfatizando o desenvolvimento de resistência hepática à insulina. Apesar disso, o acúmulo hepático de gordura nos animais MSG<sub>120</sub> não se elevou em comparação aos MSG<sub>60</sub>, assim como seus respectivos controles. Entretanto, a análise histopatológica revelou que a esteatose lobular no MSG<sub>120</sub> expandiu da zona 3 para zona 2, em adição à balonização mais frequente e à maior ocorrência de infiltrados de células inflamatórias, caracterizando a



típica transição de DHGNA para EHNA. Pela literatura, a idade mais jovem descrita para a ocorrência de EHNA em camundongos tratados com MSG foi de 20 semanas de vida na linhagem Swiss<sup>(21)</sup> ou 18 semanas na C57BL/6J<sup>(35)</sup>.

MSG<sub>180</sub> apresentou essencialmente o mesmo cenário que MSG<sub>120</sub>, mas com maior acúmulo de TG hepático, bem como mais esteatose e eventuais microgranulomas e núcleos glicogenados, marcadores de lesão hepática<sup>(5)</sup>. Corroborando nosso estudo, trabalhos prévios mostraram que camundongos com obesidade MSG apresentaram predominantemente esteatose microvesicular<sup>(15, 20)</sup>. Contudo, camundongos DIAR tratados com MSG apresentaram pronunciada esteatose, enquanto os achados de NASH só foram observados depois das 29 semanas de idade<sup>(15)</sup>. Não obstante, nenhum camundongo apresentou fibrose no fígado, como evidenciado pelo corante Tricromo de Masson. Similar aos humanos<sup>(36)</sup>, a fibrose parece um evento a médio/longo prazo na progressão da DHGNA de camundongos, uma vez que fibrose branda neste modelo é descrita apenas a partir das 48 semanas de vida<sup>(15, 20)</sup>.

Procuramos então identificar quais variáveis foram independentemente associadas ao valor total de EAD em camundongos com obesidade MSG. Entre todas as variáveis, GRP foi a única a estar independentemente correlacionada com o valor total de EAD. GRP é um depósito de gordura de roedores cujo papel metabólico é comparável ao tecido adiposo visceral de humanos<sup>(37)</sup>. Destarte, como a DHGNA humana<sup>(38)</sup>, nossos dados suportam que o tecido adiposo visceral é um fator de risco independente para o estabelecimento e para a progressão da DHGNA em camundongos MSG. Apesar da bem documentada relação entre acúmulo de tecido adiposo visceral e menor sensibilidade periférica a insulina<sup>(39)</sup>, lipectomia da GRP não aumenta a tolerância à glicose em camundongos<sup>(40)</sup>. No entanto, maior lipólise visceral pode levar a acúmulo de gordura no fígado<sup>(41)</sup>, sugerindo o envolvimento de mecanismos lipogênicos independentes de insulina na fisiopatologia da DHGNA.

De acordo com a Hipótese dos Múltiplos Danos, fatores intestinais, endócrinos, imunológicos e ainda intestinais podem juntos promover (ou não) a inflamação tipicamente associada à progressão de DHGNA para EHNA<sup>(42)</sup>. Da mesma forma, tanto o desenvolvimento de EHNA quanto o estabelecimento de resistência à insulina estão associados a um contexto pró-inflamatório, caracterizado por citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>(43)</sup>, produzidas pelo tecido visceral inflamado e aumentado<sup>(44)</sup>. A infiltração macrocitária foi encontrada como indutora da maior expressão gênica de citocinas no tecido adiposo visceral de camundongos MSG com 21 semanas de vida<sup>(23)</sup>. Apesar disso, nossos camundongos MSG não mostraram níveis séricos de citocinas alterados

quando comparados aos controles, corroborando um estudo anterior que mostrou que camundongos MSG com 6 meses de vida tinham altos níveis hepáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6, mas não séricos<sup>(45)</sup>.

Hepatócitos secretam citocinas e corpos apoptóticos em resposta ao acúmulo de lipídeos, ativando células inflamatórias como neutrófilos e células de Kupffer<sup>(46, 47)</sup>. Em particular, as células de Kupffer respondem a sinais precoces de lesão do hepatócito, desencadeando a inflamação de baixo grau hepática, uma resposta inflamatória mais branda associada principalmente à obesidade e outros distúrbios metabólicos<sup>(48)</sup>. Nós não analisamos a expressão gênica ou a síntese de citocinas no fígado, sendo uma limitação do nosso estudo. Entretanto, a infiltração hepática de células inflamatórias encontrada nos camundongos MSG<sub>120</sub> e MSG<sub>180</sub>, associada a alto teor de TG e gorduras totais no fígado, nos permitem sugerir uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias no microambiente hepático dos animais MSG. De forma interessante, Yamazaki et al relataram a ausência de infiltrados neutrofílicos, mas maior expressão gênica TNF- $\alpha$  no fígado de camundongos MSG de 16 semanas de vida<sup>(49)</sup>.

Deste modo, estes dados mostram que os camundongos MSG exibem um início precoce de acúmulo de gordura e o período entre 60 e 120 dias de vida compreendem uma janela crucial de eventos fisiopatológicos envolvidos na progressão de DHGNA para EHNA. Comparando a resultados da literatura, esta é a primeira vez que achados de EHNA são descritos em camundongos MSG tão jovens. Desta forma, nosso estudo dá suporte ao modelo de obesidade MSG como uma ferramenta para futuras investigações em mecanismos moleculares precoces por trás da DHGNA e sua progressão a médio e longo prazo para estágios mais avançados da doença.

**REFERÊNCIAS**

1. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73-84.
3. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
4. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:145-71.
5. Yeh MM, Brunt EM. Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;147(4):754-64.
6. Larter CZ. Not all models of fatty liver are created equal: understanding mechanisms of steatosis development is important. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(9):1353-4.
7. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11963-80.
8. Hebbard L, George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(1):35-44.
9. Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1971;30(1):75-90.
10. Tanaka K, Shimada M, Nakao K, Kusunoki T. Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period and subsequent development of obesity. *Exp Neurol*. 1978;62(1):191-9.
11. Holzwarth-McBride MA, Sladek JR, Jr., Knigge KM. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. *Anat Rec*. 1976;186(2):197-205.
12. Nemeroff CB, Lipton MA, Kizer JS. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Dev Neurosci*. 1978;1(2):102-9.

13. Sasaki F, Kawai T, Ohta M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohipophysial cells. *Anat Rec.* 1994;240(2):255-60.
14. Hernandez-Bautista RJ, Alarcon-Aguilar FJ, Del CE-VM, Almanza-Perez JC, Merino-Aguilar H, Fainstein MK, et al. Biochemical alterations during the obese-aging process in female and male monosodium glutamate (MSG)-treated mice. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11473-94.
15. Tsuneyama K, Nishida T, Baba H, Taira S, Fujimoto M, Nomoto K, et al. Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014;29(9):1736-43.
16. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, et al. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim.* 2006;55(2):109-15.
17. Dawson R, Pellemounter MA, Millard WJ, Liu S, Eppler B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):E202-6.
18. Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, et al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):725-30.
19. Nakanishi Y, Tsuneyama K, Fujimoto M, Salunga TL, Nomoto K, An JL, et al. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J Autoimmun.* 2008;30(1-2):42-50.
20. Sasaki Y, Suzuki W, Shimada T, Iizuka S, Nakamura S, Nagata M, et al. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. *Life Sci.* 2009;85(13-14):490-8.
21. Sasaki Y, Shimada T, Iizuka S, Suzuki W, Makihara H, Teraoka R, et al. Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol.* 2011;662(1-3):1-8.
22. Yoshida T, Yoshioka K, Sakane N, Umekawa T, Kondo M. Probucol prevents the progression of fatty liver in MSG obese mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1995;103(2):119-22.
23. Fujimoto M, Tsuneyama K, Fujimoto T, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation,

- and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2012;44(9):767-74.
24. Fujimoto M, Tsuneyama K, Nakanishi Y, Salunga TL, Nomoto K, Sasaki Y, et al. A dietary restriction influences the progression but not the initiation of MSG-Induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food.* 2014;17(3):374-83.
25. Guerrero-Romero F, Simental-Mendia LE, Gonzalez-Ortiz M, Martinez-Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernandez-Gonzalez SO, et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3347-51.
26. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-21.
27. Hidalgo B, Goodman M. Multivariate or multivariable regression? *Am J Public Health.* 2013;103(1):39-40.
28. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, et al. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21833-57.
29. Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(3):426-33.
30. Cameron DP, Cutbush L, Opat F. Effects of monosodium glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism in insulin secretion. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1978;5(1):41-51.
31. Marçal AC, Grassioli S, da Rocha DN, Puzzi MA, Gravena C, Scomparin DX, et al. The dual effect of isoproterenol on insulin release is suppressed in pancreatic islets from hypothalamic obese rats. *Endocrine.* 2006;29(3):445-9.
32. de Freitas Mathias PC, Grassioli S, Rocha DN, Scomparin DX, Gravena C. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. *Transplantation proceedings.* 2007;39(1):193-5.
33. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-51.

34. Vatner DF, Majumdar SK, Kumashiro N, Petersen MC, Rahimi Y, Gattu AK, et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):1143-8.
35. Takai A, Kikuchi K, Kajiyama Y, Sugiura A, Negishi M, Tsunashima H, et al. Serological and Histological Examination of a Nonalcoholic Steatohepatitis Mouse Model Created via the Administration of Monosodium Glutamate. *Int Sch Res Notices*. 2014;2014:725351.
36. Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 2009;51(2):371-9.
37. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Frontiers in nutrition*. 2016;3.
38. Chung GE, Kim D, Kwark MS, Kim W, Yim JY, Kim YJ, et al. Visceral adipose tissue area as an independent risk factor for elevated liver enzyme in nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(9):e573.
39. Bastard J-P, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European cytokine network*. 2006;17(1):4-12.
40. Shi H, Strader AD, Woods SC, Seeley RJ. The effect of fat removal on glucose tolerance is depot specific in male and female mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;293(4):E1012-E20.
41. Thörne A, Löfgren P, Hoffstedt J. Increased Visceral Adipocyte Lipolysis—A Pathogenic Role in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(10):E209-E13.
42. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.
43. Magee N, Zou A, Zhang Y. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5170402.
44. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson P-A, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB Journal*. 2006;20(9):1540-2.

45. Zhang N, Huan Y, Huang H, Song G, Sun S, Shen Z. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmacol Sin.* 2010;31(1):35-42.
46. Hirsova P, Ibrahim SH, Krishnan A, Verma VK, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology.* 2016;150(4):956-67.
47. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology.* 2003;38(5):1188-98.
48. Nati M, Haddad D, Birkenfeld AL, Koch CA, Chavakis T, Chatzigeorgiou A. The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2016;17(1):29-39.
49. Yamazaki Y, Usui I, Kanatani Y, Matsuya Y, Tsuneyama K, Fujisaka S, et al. Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(5):E1179-86.

## TABELAS

Tabela 1: Parâmetros morfométricos

|  | 60 dias     |                          | 120 dias                |                           | 180 dias                |                            |
|--|-------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|
|  | Controle    | MSG                      | Controle                | MSG                       | Controle                | MSG                        |
| <b>Peso corporal (g)</b>                                   | 29.3 ± 0.9  | 21.7 ± 1.3 <sup>*</sup>  | 32.9 ± 1.2              | 31.7 ± 1.7                | 40.0 ± 2.9              | 48.4 ± 3.2 <sup>*</sup>    |
| <b>NA (cm)</b>   | 9.6 ± 0.1   | 7.6 ± 0.1 <sup>*</sup>   | 10.4 ± 0.1 <sup>#</sup> | 8.3 ± 0.1 <sup>*#</sup>   | 10.6 ± 0.2 <sup>#</sup> | 9.3 ± 0.3 <sup>*#§</sup>   |
| <b>Índice de Lee<br/>(g<sup>1/3</sup>.cm<sup>-1</sup>)</b> | 320.2 ± 2.2 | 362.9 ± 2.9 <sup>*</sup> | 307.5 ± 3.3             | 365.1 ± 2.2 <sup>*</sup>  | 321.9 ± 5.1             | 381.9 ± 3.6 <sup>*</sup>   |
| <b>GRP (%PC)<sup>†</sup></b>                               | 0.42 ± 0.06 | 0.78 ± 0.05 <sup>*</sup> | 0.28 ± 0.04             | 1.33 ± 0.09 <sup>*#</sup> | 0.65 ± 0.21             | 1.43 ± 0.10 <sup>*#*</sup> |
| <b>GPE (%PC)</b>   | 0.92 ± 0.06 | 2.80 ± 0.12 <sup>*</sup> | 0.85 ± 0.09             | 4.93 ± 0.22 <sup>*#</sup> | 0.78 ± 0.24             | 3.4 ± 0.15 <sup>*#§</sup>  |
| <b>Peso do fígado<br/>(%PC)</b>                            | 4.54 ± 0.12 | 3.17 ± 0.13 <sup>*</sup> | 4.89 ± 0.27             | 3.33 ± 0.09 <sup>*</sup>  | 4.53 ± 0.25             | 2.94 ± 0.15 <sup>*</sup>   |

N= 5-7, média ± erro padrão da média, teste t de Student para MSG vs Controle na mesma idade; ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para os subgrupos MSG /Controle. \*p <0,05 vs Controle (em uma mesma idade), # p <0,05 vs 60 dias (em um mesmo grupo).

GRP = gordura retroperitoneal

GPE = gordura periepípididimal

BW = peso corporal



**Tabela 02:** Análise Multivariada do valor total de NAS

|                      | <b>Or</b> | <b>P valor</b> | <b>Intervalo de confiança de 95%</b> |          |
|----------------------|-----------|----------------|--------------------------------------|----------|
| <b>Idade</b>         | 0,998     | 0,801          | 0,9820275                            | 1,014265 |
| <b>Grupo</b>         | 25,753    | 0,160          | 0,2494428                            | 2658,822 |
| <b>TG sérico</b>     | 1,013     | 0,250          | 0,9897938                            | 1,038009 |
| <b>GLC</b>           | 1,008     | 0,319          | 0,9911746                            | 1,026361 |
| <b>GR</b>            | 16,948    | 0,017          | 1,735709                             | 165,4992 |
| <b>GP</b>            | 0,951     | 0,914          | 0,3677451                            | 2,461423 |
| <b>Índice de Lee</b> | 0,948     | 0,085          | 0,8922872                            | 1,00797  |
| <b>TyGvalue</b>      | 0,380     | 0,309          | 0,0556988                            | 2,605402 |
| <b>TG hepático</b>   | 1,011     | 0,449          | 0,9805903                            | 1,043728 |
| <b>GT hepática</b>   | 0,999     | 0,947          | 0,9790255                            | 1,020057 |

R-Quadrado = 71,43%; TG: triglicerídeo; GLC: glicemia de jejum; GR: gordura retroabdominal; GP: gordura periepididimal; GT: gordura total.

## LEGENDAS

### Figura 1

#### Perfil sérico e avaliação da resistência insulínica por TyG

Camundongos Swiss receberam MSG nos seus primeiros dez dias de vida e foram eutanasiados aos 60, 120 e 180 dias de vida. Triglicerídeos séricos (A), colesterol total (B), glicemia de jejum (C) foram avaliados. O Índice TyG (D) foi calculado a partir da glicemia e da trigliceridemia de jejum. N= 5-7, média  $\pm$  erro padrão da média, \*p <0,05 vs Controle (para mesma idade), # p <0,05 vs 60 dias (para o mesmo grupo). Teste t de Student para MSG vs Controle em uma mesma idade; ANOVA pós-teste de Newman-Keuls para subgrupos MSG /Controle.

### Figura 2

#### Perfil lipídico hepático

Amostras de fígado dos camundongos MSG e controle foram retiradas para analisar o perfil lipídico. N=5-7, média  $\pm$  erro padrão da média, \*p <0,05 vs Controle (para mesma idade), # p <0,05 vs 60 dias (para mesmo grupo), § p <0,05 vs 120 dias (para mesmo grupo). Teste t de Student para MSG vs Controle em uma mesma idade; ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para subgrupos MSG /Control.

### Figura 3

#### Citocinas séricas por citometria de fluxo

As concentrações séricas de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) foram analisadas por citometria de fluxo. N=5-7, mediana, teste t de Student para MSG vs Controle em uma mesma idade; ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para subgrupos MSG /Controle.

### Figura 4

#### Histopatologia hepática e Escore de Atividade de DHGNA

Histopatologia do fígado dos camundongos controle e MSG foram analisadas e o Escore de Atividade de DHGNA foi aplicado. Setas pretas indicam infiltrados de células polimorfonucleares. 400x de aumento, coloração H&E. N= 5-7, média  $\pm$  erro padrão da média, teste t de Student para MSG vs Controle em uma mesma idade; ANOVA com pós-teste Newman-Keuls para subgrupos MSG /Controle. \*p <0,05 vs Controle (em uma mesma idade), # p <0,05 vs 60 dias (em um mesmo grupo).

**Figura 5****Achados de EHNA e ausência de fibrose**

Lesões adicionais foram encontradas em fígados de animais MSG<sub>180</sub>, tais como núcleos glicogenados (A), indicados pela seta preta, e microgranulomas (B), indicados pela seta pontilhada. 400x de aumento; A and B, coloração H&E; C e D, coloração Tricroma de Mason.

## ANEXOS

Figura 1 – Bioquímica sérica e índice Tyg

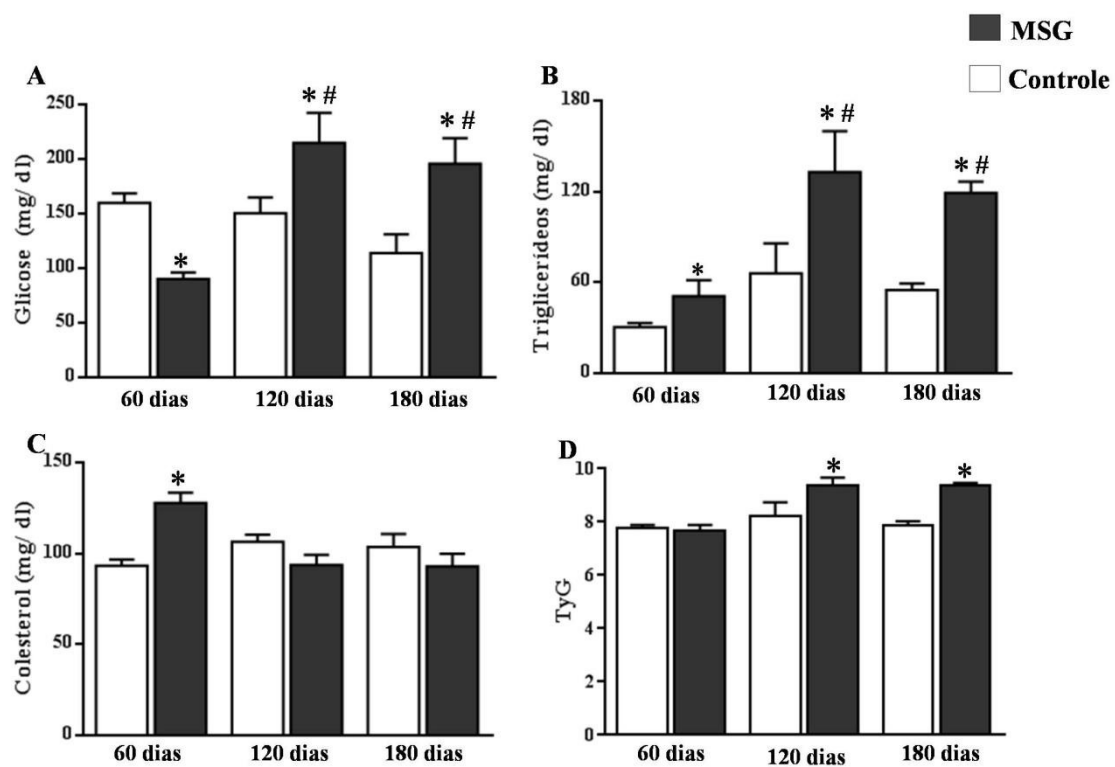


Figura 2 – Perfil lipídico hepático

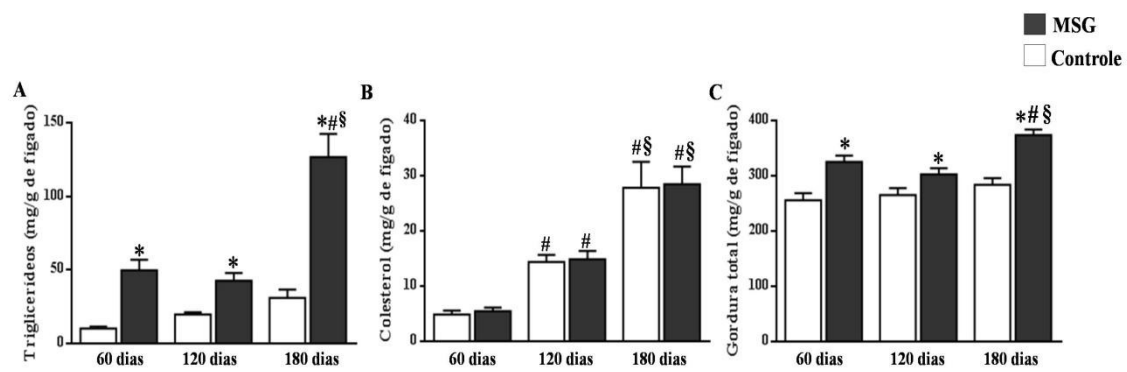
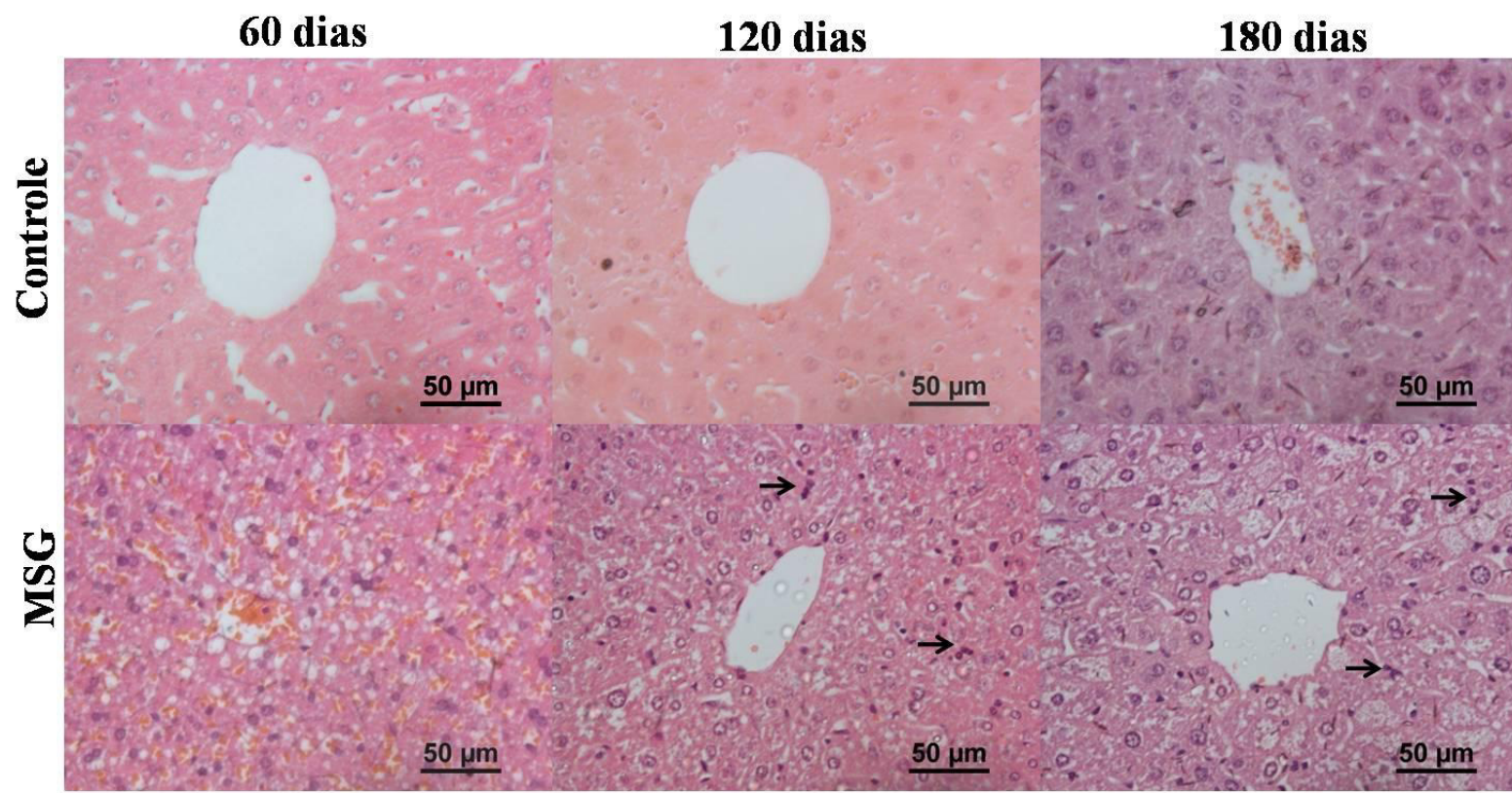


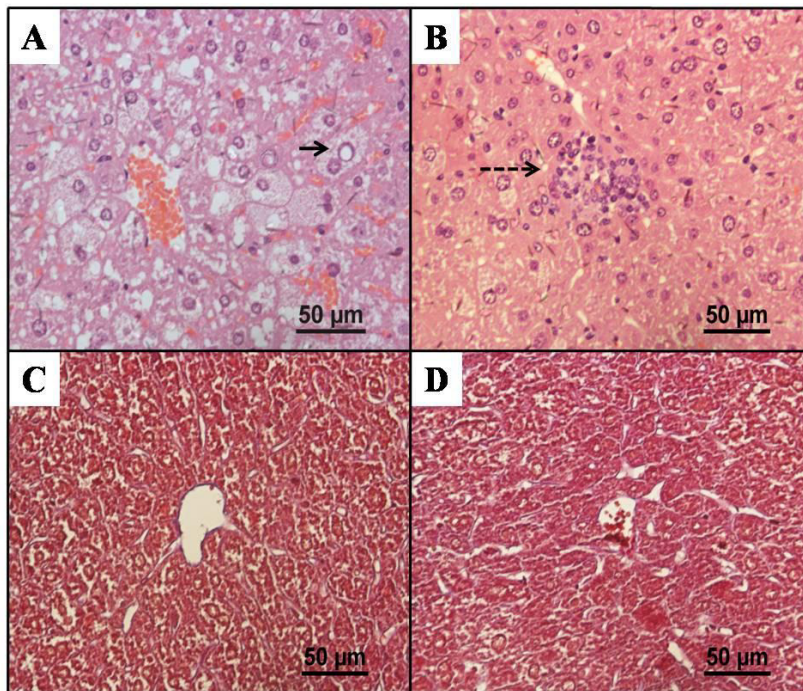


Figura 4 – Histopatologia hepática e Escore de Atividade de DHGNA



|                    | 60 dias     |               | 120 dias    |                | 180 dias    |                |
|--------------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
|                    | Controle    | MSG           | Controle    | MSG            | Controle    | MSG            |
| <b>Esteatose</b>   | 0,00 ± 0,00 | 1,20 ± 0,37*  | 0,00 ± 0,00 | 1,50 ± 0,34*   | 0,00 ± 0,00 | 2,17 ± 0,31*## |
| <b>Balonização</b> | 0,00 ± 0,00 | 0,80 ± 0,20*  | 0,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,21*## | 0,00 ± 0,00 | 1,50 ± 0,22*## |
| <b>Inflamação</b>  | 0,00 ± 0,00 | 0,21 ± 0,19   | 0,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,36*## | 0,00 ± 0,00 | 1,17 ± 0,31*## |
| <b>Total</b>       | 0,00 ± 0,00 | 2,20 ± 0,66 * | 0,00 ± 0,00 | 4,00 ± 0,68*## | 0,00 ± 0,00 | 4,83 ± 0,60*## |

**Figura 5 – Achados de EHNA e ausência de fibrose**





## Regras de submissão da revista

# Journal of Gastroenterology and Hepatology

© Journal of Gastroenterology and Hepatology Foundation and John Wiley & Sons Australia, Ltd



Edited By: Mamoru Watanabe

Impact Factor: 3.452

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2016: 26/79 (Gastroenterology & Hepatology)

Online ISSN: 1440-1746

### *Author Guidelines*

#### **Sections**

[1. SUBMISSION](#)

[2. AIMS AND SCOPE](#)

[3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS](#)

[4. PREPARING THE SUBMISSION](#)

[5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS](#)

[6. AUTHOR LICENSING](#)

[7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE](#)

[8. POST PUBLICATION](#)

[9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS](#)

#### **1. SUBMISSION**

Authors should kindly note that submission implies (i) that the content has not been published previously, in any language, in whole or in part, except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium; and (ii) that the manuscript is not currently under consideration for publication elsewhere.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jgh>

Click here for more details on how to use [ScholarOne](#).

For help with submissions, please contact: JGH Editorial Office, Adel Dalina

Email: [jgh.eo@wiley.com](mailto:jgh.eo@wiley.com)

## 2. AIMS AND SCOPE

*The Journal of Gastroenterology and Hepatology* (JGH) is the official journal of the Asia Pacific Association for Gastroenterology. The Journal publishes peer-reviewed original papers, reviews, metaanalyses and systematic reviews, and editorials concerned with clinical practice and research in the fields of hepatology, gastroenterology and endoscopy. Papers cover the medical, surgical, radiological, pathological, biochemical, physiological, ethical and historical aspects of the subject areas. Clinical trials are afforded expedited publication if deemed suitable. JGH also deals with the basic sciences and experimental work, particularly that with a clear relevance to disease mechanisms and new therapies. Case reports and letters to the Editor will not be considered for publication.

## 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

### Editorials

These are invited by the Editor-in-Chief or their delegated editor, and should be a brief review of the subject concerned, with reference to and commentary about one or more articles published in the same issue of JGH. Editorials are generally 1200–1500 words, may contain one table or figure and cite up to 15 references, including the source article [this should be cited as *J Gastroenterol Hepatol* (year);(vol): [this issue].

### Review Articles

JGH welcomes reviews of important topics across the scientific basis of gastroenterology and hepatology, and advances in clinical practice. Most published reviews are in response to editorial invitation, including thematically related “mini-series” of reviews. Authors considering submitting a review for JGH are advised to canvas their possible review with the Editor-in-Chief or a colleague editor; this avoids early rejection if the subject matter is not deemed a high priority for the Journal at the time of submission. Reviews are limited to 3500–5000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 75 references and 3–7 figures or tables.

### Meta-Analyses or Systematic Reviews

JGH particularly welcomes submission of Meta-Analyses and Systematic Reviews, which underpin evidence-based medicine. From time to time, an honorarium for preparation of these articles may be made available by the JGH Foundation; for up-to-date information, check the JGH website [[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1440-1746](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1440-1746)] and recent advertisements in the Journal, or email the Editor-in-Chief. Guidelines for preparation of Meta-Analysis and Systematic Reviews are similar to other reviews, and articles are subject to the usual peer review process. Meta-Analyses and Systematic Reviews have a word limit of 3500–5000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 75 references and 3–7 figures or tables.

### Original Articles (including clinical trials)

JGH welcomes original articles concerned with clinical practice and research in the fields of hepatology, gastroenterology and endoscopy. Papers can cover the medical, surgical, radiological, pathological, biochemical, physiological, ethical and/or historical aspects of the subject areas. Clinical trials are afforded expedited publication if deemed suitable. JGH also deals with the basic sciences and experimental work, particularly that with a clear relevance to disease mechanisms and new therapies. Original articles are limited to 3000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 50 references and 3–7 figures and tables.

## Education and Imaging

The Editors welcome contributions to the Education and Imaging section (Hepatobiliary and Pancreatic or Gastrointestinal). The purpose is to present imaging for the evaluation of unusual features of common conditions or diagnosis of unusual cases. Contributions will be reviewed by the Education and Imaging Coordinating Editors. The format of the Hepatobiliary and Pancreatic Images pages involves two parts, each of which will occupy up to one journal page. In part 1, a case will be described briefly, including a summary of the presentation, clinical features and key laboratory results. One to two key images will then be presented. It is helpful to the reader if the author responds to questions that follow from the images of the case, such as 'What is your diagnosis? What are the features indicated on the CT scan? What is the differential diagnosis?' Part 2 will briefly describe the imaging features, particularly those that lead to diagnosis or which are critical for management. Differential diagnosis should be mentioned. It will be useful to include either further images or pathological details that validate the imaging diagnosis. Occasionally, presentation of analogous cases or related images from a similar case might be appropriate. Please include between one and three references to definitive studies and appropriate reviews of the subject. The format of the Gastrointestinal Images page involves a brief background to and description of the disorder of interest together with two figures of high quality. Colored endoscopic photographs are encouraged. The submission may take the form of a case report or may illustrate particular features from more than one patient.

## 4. PREPARING THE SUBMISSION

### Style

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the International Committee of Medical Journal Editors' revised 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication', as presented at <http://www.ICMJE.org/>.

**Format.** Manuscripts should use 1.5 line spacing.

**Spelling.** The journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the Merriam-Webster's Collegiate Dictionary.

**Units.** All measurements must be given in SI units as outlined in the latest edition of Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors (Royal Society of Medicine Press, London).

**Abbreviations** should be used sparingly and only where they ease the reader's task by reducing repetition of long technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation.

**Trade names** should not be used. Drugs should be referred to by their generic names, rather than brand names.

### Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: title page; main text file; figures.

### Title page

The title page should contain:

(i) A short informative title that contains the major key words. The title should not contain

abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#)). Titles must not be longer than 120 characters (including spaces);

- (ii) The full names of the authors;
- (iii) The author's institutional affiliations at which the work was carried out;
- (iv) The full postal and email address, plus telephone number, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent;
- (v) Disclosure statement; and
- (vi) Acknowledgements.

The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote.

### **Disclosure statement**

The source of financial grants and other funding should be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. In the case of clinical trials or any article describing use of a commercial device, therapeutic substance or food must state whether there are any potential conflicts of interest for each of the authors: failure to make such a statement may jeopardise the article being sent out for peer-review.

For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

### **Acknowledgments**

The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not allowed.

### **Main text**

As papers are double-blind peer reviewed the main text file should not include any information that might identify the authors.

The main text of the manuscript should be presented in the following order: (i) title, abstract and key words, (ii) text, (iii) references, (iv) tables (each table complete with title and footnotes), (vii) figure legends. Figures and supporting information should be submitted as separate files. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

### **Abstract and keywords**

All articles, with the exception of Editorials, must contain a structured abstract that states in 250 words or less the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. Divide the abstract with the headings: *Background and Aim, Methods, Results, Conclusions*. The abstracts of reviews need not be structured. The abstract should not contain abbreviations or references.

Three to five keywords should be supplied below the abstract and should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

### **Text**

Authors should use subheadings to divide the sections of their manuscript: *Introduction, Methods, Results, Discussion*.

### References

- The Vancouver system of referencing should be used. In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited only in tables or figure legends, number them according to the first identification of the table or figure in the text.
- In the reference list, the references should be numbered and listed in order of appearance in the text.
- Cite the names of all authors when there are six or less; when seven or more list the first three followed by et al.
- Names of journals should be abbreviated in the style used in [MEDLINE](#).
- Only literature that is published or in press (with the name of the publication known) should be cited in the reference list. Abstracts and letters to the editor may be cited, but they must be less than 3 years old and identified as such. Reference to unpublished data, submitted manuscripts and personal communications should appear in the text only as in the following example: (Chercheur X, unpublished data). If the owner of the unpublished data or personal communication is not an author of the manuscript under review, a signed statement is required verifying the accuracy of the attributed information and agreement to its publication.
- List all authors up to six, using six and "et al." when the number is greater than six.

References should be listed in the following form:

#### *Journal articles*

1 Crawley AC, Brook DA, Muller VJ, Petersen BA, Isaacs EL, Biekicki J, et al. Enzyme replacement therapy in feline model of the Matroteaux-Lamysyndrome. *J Clin Invest* 1996; 97: 1864-1873.

#### *Book*

2 Watson JD. *The Double Helix*. New York: Atheneum, 1968: 1-6.

#### *Book Chapters*

3 Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. In: Sleisinger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal Disease*. Volume 1. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1993: 127-150.

#### *Abstract or Article in a Supplement*

4 Klin M, Kaplowitz N. Differential susceptibility of hepatocystesto TNF-induced apoptosis vs necrosis [Abstract]. *HEPATOLOGY* 1998; 28(Suppl): 310A.

#### *Journal article in electronic format*

4 Spycher C, Zimmerman A, Reichen J. The diagnostic value of liver biopsy. *BMC Gastroenterol*. 2001; 1: 12. Cited 22 Nov 2007. Available from URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/1/12>.

#### *Online article not yet published in an issue*

An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

5. Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J.Gastroenterol. Hepatol* 2009 doi 10.1111/j.1440-1746.2009.05854.x

### Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Number tables consecutively in the text in Arabic numerals. Type tables on a separate page with the legend above. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶ should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for *P*-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

### Figure legends

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement. Indicate the stains used in histopathology. Identify statistical measures of variation, such as standard deviation and standard error of the mean.

### Figures

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be numbered using Arabic numerals, and cited in consecutive order in the text. Each figure should be supplied as a separate file, with the figure number incorporated in the file name.

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

**Color figures.** If you wish to reproduce figures in colour in print a charge of US\$530 for the first three color figures and US\$265 for each extra color figure thereafter will be charged to the author. If you do not wish to pay for color production in print, your color figures can be reproduced in color online for free. This only applies to figures which are appropriate for reproduction in color online, but black and white in the printed journal. This is not possible for some figure types such as line figures where the figure would have to be altered for print publication (changing colours to grey shading) therefore making the print and online figures different.

### Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

### Wiley Author Resources

**Manuscript Preparation Tips:** Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

**Editing, Translation, and Formatting Support:** [Wiley Editing Services](#) can greatly improve the chances of a manuscript being accepted. Offering expert help in English language editing, translation, manuscript formatting, and figure preparation, Wiley Editing Services ensures that the manuscript is ready for submission.

#### **COVER LETTER REQUIREMENTS**

A cover letter containing an authorship statement should be included in the 'Cover Letter Field' of the ScholarOne system. The text can be entered directly into the field or uploaded as a file (at Step 5: Details & Comments).

The cover letter should include a statement covering each of the following areas:

1. Confirmation that all authors have contributed to and agreed on the content of the manuscript, and the respective roles of each author.
2. Confirmation that the manuscript has not been published previously, in any language, in whole or in part, and is not currently under consideration elsewhere. (The journal's position on possible dual publication in more than one language has been outlined in the following editorial: *Farrell GC. Déjà vu, mais pas en anglais!* Precautionary notes on publishing the same article in two languages. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 22: 1699-1700).
3. A statement outlining how ethical clearance has been obtained for the research, particularly in relation to studies involving human subjects, and animal experimentation. The institutional ethics committees approving this research must comply with acceptable international standards (such as the Declaration of Helsinki) and this must be stated.
4. For research involving pharmacological agents, devices or medical technology, a clear Conflict of Interest statement in relation to any funding from or pecuniary interests in companies that could be perceived as a potential conflict of interest in the outcome of the research.
5. For clinical trials, that these have been registered in a publicly accessible database (see more under 'EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS (Further Information)' later in these guidelines).

If the above items are not included in the cover letter, manuscripts cannot be sent for review.

Please also note that the cover letter does not require a detailed or lengthy description of the content or structure of the manuscript itself.

## **5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS**

### **Editorial Review and Acceptance**

The acceptance criteria for all papers and reviews are based on the quality and originality of the research and its clinical and scientific significance to our readership. All manuscripts are double-blind peer reviewed under the direction of an Editor. The Editor reserves the right to refuse any material for review.

### **Principles for Publication of Research Involving Human Subjects**

Manuscripts must contain a statement to the effect that all human studies have been reviewed by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in an appropriate version of the Declaration of Helsinki (as revised in Brazil 2013), available at <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under the study should be omitted. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used).

### **Registration of Clinical Trials**

We strongly recommend, as a condition of consideration for publication, registration in a public trials registry. Trials register at or before the onset of patient enrolment. This policy applies to any clinical trial starting enrolment after July 1, 2008. For trials that began enrolment before this date, we request registration by December 1, 2008, before considering the trial for publication. We define a clinical trial as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g., phase 1 trials) are exempt.

We do not advocate one particular registry, but registration with a registry that meets the following minimum criteria:

- (1) accessible to the public at no charge;
- (2) searchable by standard, electronic (Internet-based) methods;
- (3) open to all prospective registrants free of charge or at minimal cost;
- (4) validates registered information;
- 5) identifies trials with a unique number; and
- (6) includes information on the investigator(s), research question or hypothesis, methodology, intervention and comparisons, eligibility criteria, primary and secondary outcomes measured, date of registration, anticipated or actual start date, anticipated or actual date of last follow-up, target number of subjects, status (anticipated, ongoing or closed) and funding source(s).

Registries that currently meet these criteria include, but are not limited to:

- (1) the registry sponsored by the United States National Library of Medicine ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov));
- (2) the International Standard Randomized Controlled Trial Number Registry (<http://www.controlled-trials.com>);
- (3) the Australian Clinical Trials Registry (<http://www.actr.org.au>);
- (4) the Chinese Clinical Trials Register (<http://www.chictr.org>); and
- (5) the Clinical Trials Registry—India (<http://www.ctri.in>); (6) University hospital Medical Information Network (UMIN) (<http://www.umin.ac.jp/ctr/>).

### **Randomized Controlled Trials**

Reporting of randomized controlled trials should follow the guidelines of The CONSORT Statement: <http://www.consort-statement.org> Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to international standards for animal usage in research. These include but are not limited to the NHMRC of Australia, NIH and European Union.



### **Conflict of Interest Statement**

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript.

Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Publication Ethics**

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read the [Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found at [authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html](http://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html).

## **6. AUTHOR LICENSING**

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [OnlineOpen](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please [click here](#). (Note that certain funders mandate a particular type of CC license be used; to check this please click [here](#).)

**Self-Archiving Definitions and Policies:** Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

**Open Access fees:** Authors who choose to publish using OnlineOpen will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

**Funder Open Access:** Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

## **7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE**

### **Accepted Article Received in Production**

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with [Wiley Author Services](#). The author will be asked to sign a publication license at this point.

### **Accepted Articles**

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final

acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article. Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

### **Proofing**

The corresponding author will receive an email with details on how to provide proof corrections. It is therefore essential that a working email address be providing for the corresponding author.

### **Early View**

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before allocation to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

## **8. POST PUBLICATION**

### **Access and Sharing**

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Print copies of the article can now be ordered (instructions are sent at proofing stage or email [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com))

To find out how to best promote an article, click [here](#).

### ***Measuring the Impact of an Article***

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

## **9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS**

JGH Editorial Office

Adel Dalina

Email: [jgh.eo@wiley.com](mailto:jgh.eo@wiley.com)

*AuthorGuidelinesupdated 29 March 2017*

**Aceite de submissão da revista**

20/08/2017

Journal of Gastroenterology and Hepatology - Account Created in Manuscript Central

**Journal of Gastroenterology and Hepatology - Account Created in Manuscript Central**

Journal of Gastroenterology and Hepatology <onbehalf+jgh.eo+wiley.com@ma  
Responder | Excluir Lixo eletrônico | Responder

qui 27/07, 16:34  
Você

Caixa de Entrada

27-Jul-2017

Dear Mr. Coelho:

A manuscript titled Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice (JGH-01302-2017) has been submitted by Prof. Antonio Paes to the Journal of Gastroenterology and Hepatology.

You are listed as a co-author for this manuscript. Therefore our online peer-review system, Manuscript Central, automatically created a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/jgh>

USER ID: cc\_fernando@hotmail.com

PASSWORD: [https://mc.manuscriptcentral.com/jgh?URL\\_MASK=a1f0691c4520490da335874f89fcddf](https://mc.manuscriptcentral.com/jgh?URL_MASK=a1f0691c4520490da335874f89fcddf)

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jgh> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Journal of Gastroenterology and Hepatology  
Editorial Office