UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

CAMILA SANCHES MANCA

**Efeitos dos diferentes ácidos graxos no metabolismo
lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL
alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose**

Ribeirão Preto/ SP

2017

CAMILA SANCHES MANCA

Efeitos dos diferentes ácidos graxos no metabolismo lipídico e estresse oxidativos em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose

Versão original

Dissertação apresentada Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior

Ribeirão Preto/SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Manca, Camila Sanches

Efeitos de diferentes ácidos graxos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlídica e rica em frutose.

89 p; il.;30 cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior.

1. Óleos vegetais comerciais. 2. Frutose. 3. Estresse Oxidativo.
4. Camundongos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Camila Sanches Manca

Título: **Efeitos dos diferentes ácidos graxos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos meus pais, toda minha família,
meu namorado.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelas oportunidades concebidas, pela saúde, por me guiar nesse caminho e ajudar a não desistir diante das dificuldades e por me proporcionar luz e sabedoria para as melhores escolhas.

Agradeço a meu querido orientador Prof. Alceu Afonso Jordão Junior pela oportunidade concebida, pela confiança, pela amizade e todo conhecimento transmitido ao longo desses anos. Obrigado por acreditar no meu potencial e abrir as oportunidades.

Apoio técnico Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Livia M e Paula P. obrigado pela ajuda e o companheirismo. Renata L, pelo auxílio.

Apoio técnico do biotério: Adalberto Verceze, Roni Charles e Maurício Arantes gostariam imensamente de agradecer todo conhecimento compartilhado e pelos dias agradáveis.

Agradeço imensamente a meus pais José Ricardo e Flávia, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo aos meus estudos e acreditar no meu potencial.

Agradeço a meus avos e tios pelas orações, apoio nas horas difíceis e todos os ensinamentos.

Agradeço meu namorado Alexandre pelo companheirismo, paciência e confiança e toda sua família pelo apoio, em especial Lilinha e João.

Agradeço aos colegas de pós graduação e graduação: Priscila Bezan, Gabriela Salim, Mirele Mialich, Heric Holland, Tiago G, Marcel Nani, Andréa Leone, Leticia Borges, Bruna Ramos, Ana Paula P.

Agradeço os alunos do Curso de Nutrição e Metabolismo pelos ensinamentos.

Agradeço Prof. Leandra Zambelli e Prof. Fernando Ramalho, pela parceria, paciência e os ensinamentos.

Agradeço a amizade e todo conhecimento transmitido ao longo desses anos de Juliana Sicchieri.

Agradeço aos secretários da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica, Emerson Quirino de Oliveira e Airton Isiara pela dedicação e paciência.

Agradeço a Clínica Médica pela oportunidade.

Agradeço a À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de Mestrado e (Processo nº 2015/ 01348-6).

Manca, C.S. Efeitos de diferentes ácidos graxos no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose. 2017. 89 f. Dissertação Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017.

RESUMO

A esteatose hepática não alcoólica está relacionada às causas crescentes de morbimortalidade de doenças hepáticas. Sua incidência está relacionada à obesidade e comorbidades vinculadas a esta, na qual tem despertado grande interesse na pesquisa. A modulação quantitativa da dieta pode promover ou retardar a patologia. Desta forma, terapias voltadas para retardar ou diminuir a esteatose hepática não alcoólica poderiam atenuar o dano hepático, melhorar a função hepática e reduzir sua progressão. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar o consumo de óleos vegetais ricos em MUFAs e PUFAs usados comercialmente na prevenção ou redução da esteatose hepática analisando parâmetros do metabolismo lipídico hepático e sérico, estresse oxidativo e retardando a progressão de NAFLD. Material e Métodos: os animais foram divididos nos seguintes grupos: Controle (n=10) + HLF * (n=10); Grupo HLF * AZ (n=10); Grupo HLF* CN (n=10); Grupo HLF* S (n=10). Após 16 semanas de dieta e tratamento com os respectivos óleos, os animais foram anestesiados e o sangue retirado por punção cardíaca e os tecidos para as análises posteriores. Resultados: A oferta de uma dieta rica em gordura saturada (banha) + frutose ocasionou um aumento do peso no grupo HLF enquanto a administração dos respectivos óleos vegetais foi capaz de retardar o ganho de peso. O peso hepático e da soma dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal foi maior no HLF enquanto houve redução significativa no peso hepático HLF/S. O tecido retroperitoneal foi menor no HLF/CN. De uma maneira geral o tratamento com os respectivos óleos vegetais diminuiu a esteatose em todos os grupos experimentais. A oferta de azeite extra virgem não refletiu no ganho de peso, porém o grupo teve um aumento significativo de TG e VLDL séricos, com diminuição do colesterol sérico. Avaliado histologicamente diminuiu o score de esteatose quando comparado ao HLF sendo classificado como esteatose macro e microvesicular de leve a moderada. O óleo de soja apresentou uma maior quantidade de PUFAs, sendo rico em n-6, refletiu na manutenção do peso dos animais, diminuiu a esteatose, sendo classificado como esteatose leve, quando comparado ao HLF, porém aumentou o colesterol sérico. Apresentou um aumento de MDA e diminuição de GSH hepático. O óleo de canola devido a seu teor em ácidos graxos PUFAs (n-6 e n-3) teve maior incorporação do EPA e DHA que parecem ter evidenciado positivamente. Não apresentou alteração nos parâmetros bioquímicos e apresentou menor acúmulo de gordura hepática através da análise do percentual de gordura hepática e histopatologia, sendo caracterizado como esteatose leve. Pela peroxidação lipídica apresentou um maior acúmulo de MDA, porém um aumento de GSH. Contudo, a oferta dos respectivos óleos influenciou positivamente em diferentes mecanismos fisiológicos.

Palavras – chave: ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos saturados, frutose, camundongo C57/BL.

Manca, C.S. Effects of different fatty acids on lipid metabolism and oxidative stress in C57/BL mice fed a high fat diet and rich in fructose. 2017. 89 f. Dissertação Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2017.

ABSTRACT

The Non-alcoholic fatty liver is related to the increasing causes of morbidity and mortality of liver diseases. Its incidence is related to obesity and comorbidities linked to it, in which it has awakened great interest in the research. The disease is associated to genetic predisposition, lack of physical activity and high intake of saturated fats and fructose. Quantitative modulation of the diet may promote or retard the pathology. Thus, therapies aimed at delaying or decreasing non alcoholic hepatic steatosis could alleviate liver damage, improve liver function and reduce its progression. The objectives of the present study were: to evaluate the consumption of vegetable oils rich in commercially available MUFAs and PUFAs in the prevention or reduction of hepatic steatosis by analyzing parameters of hepatic and serum lipid metabolism, oxidative stress and delaying the progression of NAFLD. Material and Methods: animals were divided into the following groups: Control (n = 10) + HLF * (n = 10); Group HLF * AZ (n = 10); Group HLF * CN (n = 10); Group HLF * S (n = 10). After 16 weeks of diet and treatment with the respective oils, the animals were anesthetized and blood was withdrawn by cardiac puncture and tissues for further analysis. Results: The supply of a diet rich in saturated fat (lard) + fructose caused an increase in weight in the HLF group while the administration of the respective vegetable oils was able to delay the weight gain. Liver weight and sum of epididymal and retroperitoneal adipose tissues were higher in HLF while there was a significant reduction in HLF / S hepatic weight. Retroperitoneal tissue was lower in HLF / CN. In general, treatment with the respective vegetable oils decreases steatosis in all experimental groups. The supply of extra virgin olive oil did not reflect weight gain, but the group had a significant increase in serum TG and VLDL, with a decrease in serum cholesterol. Histologically it reduced the steatosis score when compared to the HLF being classified as mild to moderate macro and microvesicular steatosis. Soybean oil presented a higher amount of PUFAs, being rich in n-6, reflected in the maintenance of animal weight, decreased steatosis, being classified as mild steatosis when compared to HLF, but increased serum cholesterol. He presented an increase of MDA and decrease of hepatic GSH. Canola oil due to its content of PUFAs (n-6 and n-3) had greater incorporation of EPA and DHA than appear to have been positively evidenced. There was no alteration in the biochemical parameters and presented lower accumulation of liver fat through the analysis of the percentage of liver fat and histopathology, being characterized as mild steatosis. By the lipid peroxidation presented a greater accumulation of MDA, but an increase of GSH. However, the supply of the respective oils had a positive influence on different physiological mechanisms.

Key words: Polyunsaturated fatty acids (PUFAS). Monounsaturated fatty acids (MUFAS). Saturated fatty acids (AGS). Fructose. Mouse C57 / BL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios evolutivos da doença.....	20
Figura 2 - Evolução de peso semanal dos animais ao longo das 16 semanas experimentais.....	45
Figura 3 - Ingestão alimentar ao longo do período experimental.	47
Figura 4 - Evolução semanal de ingestão energética (kcal).....	48
Figura 5 - Valores médios de triacilgliceróis, lipoproteína de baixa densidade, colesterol total e lipoproteína de alta densidade séricos.	53
Figura 6 - Glicemia e razão Triacilgliceróis/HDL	54
Figura 7 - Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E hepáticos nos diferentes grupos experimentais.	55
Figura 8 - Gordura hepática total, Triacilgliceróis e Colesterol hepáticos.....	56
Figura 9 - Microfotografias hepáticas	57
Figura 10 - Avaliação do escore de esteatose hepática não alcóolica.	58

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais g/100 g da dieta.	34
Tabela 2 - Composição centesimal da banha de porco e dos óleos vegetais utilizados no presente estudo.....	43
Tabela 3 - Índice de peroxidabilidade dos óleos e banha utilizados na dieta.....	44
Tabela 4 - Índice de peroxidabilidade das dietas utilizadas.	44
Tabela 5 - Peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais durante o experimento.....	45
Tabela 6 - Ingestão diária (g/dia), ingestão energética diária (kcal/dia) e Taxa de eficiência da dieta.....	49
Tabela 7 - Peso hepático, peso tecido epididimal, retroperitoneal, somatórios e razões.	51
Tabela 8 - Valores médios de triacilgliceróis, lipoproteína de baixa densidade, colesterol total e lipoproteína de alta densidade séricos.	52
Tabela 9 - Valores médios de glicemia e razão Triacilgliceróis/HDL.....	53
Tabela 10 - Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E hepáticos nos diferentes grupos experimentais.	55
Tabela 11 - Gordura hepática total, Triacilgliceróis e Colesterol hepáticos.....	56
Tabela 12 - Avaliação do score de esteatose hepática não alcoólica.	58
Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos hepáticos nos diferentes grupos estudados.	61
Tabela 14 - Razão somatório, razões n6/n3 e razões das conversões.....	62
Quadro 1 - Resumo dos parâmetros séricos estudados.	63
Quadro 2- Resumo dos parâmetros hepáticos estudados.	64
Quadro 3 - Resumo do perfil de ácidos graxos hepáticos.	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGS – Ácidos graxos saturados

ALT – alanina aminotransferase.

AST – aspartato aminotransferase

ChREBP – *carbohydrate-responsive element-binding protein*.

CT – grupo controle

DHA - Ácido Docosaexaenoico

ERs: Espécies reativas do oxigênio

EPA - Ácido Eicosapentaenoico

GSH – glutathiona reduzida.

HDL – lipoproteína de alta densidade.

HLF/AZ: grupo hiperlipídica frutose + azeite

HLF/CN – grupo hiperlipídica frutose + canola

HLF/S – grupo hiperlipídica frutose + soja

LDL – lipoproteína de baixa densidade.

MDA: Malondialdeído

MUFAs – ácidos graxos monoinsaturados.

n-3 – ácido graxo poli-insaturado ômega-3.

n-6 – ácido graxo poli-insaturado ômega-6.

NAFLD – esteatose hepática não alcoólica.

NASH – esteato-hepatite não alcoólica. .

PPAR- α – *peroxisome proliferator-activated receptor α* .

PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados.

RI – resistência à insulina.

RNs: Espécies reativas do nitrogênio

SCARB1 – *scavenger receptor class B, member 1*.

SFA – ácido graxo saturado

SM – Síndrome Metabólica.

SREBP-1c – *sterol regulatory 12elemento-binding proteins 1c*.

TGs – triacilgliceróis*

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade.

Nota: Devido à denominação mais usual para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados foi usado os termos em inglês. O mesmo pode ser observado para a NASH e NAFLD.

Triacilgliceróis e triglicerídeos foram usados como sinônimo no texto.

LISTA DE ÁCIDOS GRAXOS – NOMENCLATURA USUAL

14:0	Ácido Mirístico
16:0	Ácido Palmítico
16:1	Ácido Palmitoléico
18:0	Ácido Esteárico
18:1n-9c	Ácido Oléico
18:2n-6c	Ácido Linoleico
18:3n-3	Ácido α -Linolênico
20:4n-6	Ácido Araquidônico
20:5n-3	Ácido Eicosapentaenoico
22:6n-3	Ácido Docosaexaenoico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Dietas ocidentais e NAFLD	20
1.2 MUFAS E PUFAS: Prevenção e tratamento de NAFLD.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Delineamento experimental.....	32
4.3 Peso dos animais	34
4.4 Ingestão alimentar, Ingestão energética e taxa de eficiência da dieta	34
4.5 Cálculos do índice de peroxidabilidade dos óleos vegetais e da banha de porco utilizados nas dietas experimentais.....	35
4.6 Análises.....	35
4.6.1 Determinação da composição dos Ácidos Graxos da banha de porco, azeite extra virgem, óleo de canola e óleo de soja utilizados no preparo das dietas.....	35
4.6.2 Determinação de frações lipídicas séricas	36
4.6.3 Determinação de proteína sérica e hepática	36
4.6.4 Determinação de glicemia e razão entre triglicerídeos e HDLcolesterol séricos.....	36
4.6.5 Determinação de gordura hepática total e parâmetros hepáticos	37
4.6.6 Peroxidação lipídica hepática.....	37
4.6.7 Determinação da glutatona reduzida (GSH) hepática	38
4.6.8 Determinação de Vitamina E hepática	38
4.6.9 Análise histopatológica.....	39
4.6.10 Determinação de ácidos graxos hepáticos.....	40
4.7 Análise estatística	40

5 RESULTADOS.....	42
5.1 Composição percentual de ácidos graxos da banha e dos óleos vegetais utilizados para o preparo das dietas no experimento (%)	42
5.2 Índice de peroxidabilidade da banha de porco e dos respectivos óleos vegetais comerciais utilizados no experimento.....	44
5.3 Peso dos animais	44
5.4 Ingestão alimentar, ingestão energética e taxa de eficiência da dieta (TED).....	46
5.5 Pesos do tecido hepático, peso tecido adiposo epididimal e retroperitoneal e razões em relação ao peso corporal	50
5.6 Parâmetros séricos: Triglicerídeos, Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, Colesterol Total e Lipoproteína de Alta Densidade Séricos	52
5.7 Glicemia e Razão Triacilgliceróis/ HDL colesterol	53
5.8 Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo	54
5.9 Gordura hepática total, Triglicerídeos e Colesterol hepáticos	56
5.10 Histologia hepática	57
5.11 Perfil de ácidos graxos hepáticos.....	59
5.12 Quadros comparativos	63
 6 DISCUSSÃO	 67
 7 CONCLUSÕES	 75
 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 78
 APÊNDICES	 86
Apêndice A - Evolução do peso semanal dos animais (g)	86
Apêndice B - Evolução de ingestão alimentar semanal dos animais (g).....	87
 ANEXO	 89
Anexo I - Comitê de ética animal.....	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) foi proposta pela primeira em 1980, descrevendo pacientes com esteatopatia não alcoólica (NASH) (LUDWING et al., 1980).

A esteatose hepática é causada por um desequilíbrio nas células hepáticas, sendo caracterizada pela incorporação citoplasmática macro e micro vesicular ou ambos de lipídeos, primariamente triglicerídeos (TAGs) no fígado em indivíduos que consomem menos que 30 g/dia de etanol em homens e 20 g/dia em mulheres segundo a Associação Europeia de Estudo do Fígado, não sendo afetados por outras causas do fígado gorduroso, tais como consumo de drogas ou exposição a toxinas (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007; DIETRICH; HELLERBRANDET AL, 2014).

Atualmente é considerada uma doença epidêmica emergente, sendo que sua prevalência aumentou em mais de 30% dos adultos dos países desenvolvidos, com tendência ascendente sendo caracterizada entre 20 a 50% dependendo dos critérios de definição e métodos diagnósticos utilizados em diferentes estudos (DIETRICH; HELLERBRANDET, 2014). A prevalência de NAFLD é de 80% - 90% em pacientes obesos, 30% - 50% com diabetes e acima de 90% em pacientes com hiperlipidemia. Em crianças a prevalência varia de 13% a 80%, mostrando uma correlação positiva também com a obesidade. A prevalência de NAFLD/NASH continua a crescer paralelamente com as taxas de obesidade, sendo considerada uma manifestação da síndrome metabólica, ligada fortemente à resistência à insulina. Já hoje a esteatose hepática é definida como uma doença crônica mais comum em todo o mundo (ABENAVOLI et al., 2014). No Brasil os indivíduos com NAFLD são caracterizados sendo 45% sobrepeso, 44% com diabetes tipo 2 e 41% síndrome metabólica (COTRIM et al., 2011).

A Associação Americana de Doenças Hepáticas propõe a classificação da esteatose hepática não alcoólica relacionado características histológicas com prognóstico em longo prazo: esteatose simples (classe 1); esteatose com inflamação lobular (classe 2); esteatose com a presença de hepatócitos balonizados (classe 3) ou esteatose com presença de corpúsculos de Mallory ou fibrose (classe 4) (NEUSCHWANDER, CALDWELL, 2003). A NAFLD é classificada como escore de atividade pela rede de pesquisa do “NASH Clinical” sendo caracterizada por

esteatose (0 e 3); inflamação lobular (0 e 3) e balonização dos hepatócitos (0 e 2). As taxas do score vão de 0 a 8. Escore < 3 corresponde que o indivíduo não apresenta NASH; 3 a 4 é incerto quanto a presença de NASH e a média 5 define o diagnóstico de NASH (CASTRO; CALDER, 2017). Conforme estabelecido a NAFLD vai desde esteatose assintomática á esteatohepatite não alcóolica caracterizada pela presença de apoptose, inflamação, fibrose e um curso que progressivo envolvendo a cirrose, que não é reversível e pode evoluir para um hepatocarcinoma celular (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007; FIERBINTEANU-BRATICEVIC et al., 2011). A figura 1 representa os estágios evolutivos da doença.

Algumas evidências têm apontado para a fisiopatologia primária da NAFLD e os mecanismos que levam à NASH, fibrose e dano do hepatócito que ainda não estão completamente esclarecidos, mas pode-se afirmar que a causa é poligênica e multifatorial, na qual há uma associação de genes havendo participação do ambiente e junto a este a dieta e o sedentarismo, que também tem sua importância fundamentada (TORRES et al., 2012; BASARANOGU; SENTÜRK, 2013). Deste modo, a alimentação é considerada um potencial fator de risco para esta doença (ABENAVOLI et al., 2014)

Atualmente o mecanismo mais aceito é clássica teoria dos dois hits, proposto por Day e James (1998). O primeiro *hit* é caracterizado pela esteatose, causada pelo desequilíbrio entre a formação e o *turnover* de triacilgliceróis. Acredita que a resistência à insulina (R.I) afeta o primeiro *hit* da NAFLD: ativa a secreção de adiponectinas e altera a síntese e o transporte de triacilgliceróis pelos hepatócitos e aumenta lipólise nos adipócitos com consequente liberação ácidos graxos não esterificados (Do inglês: Non Esterified Fatty Acids – NEFA), na circulação porta, expondo o fígado aos níveis excessivos de NEFAs. Existem uma diminuição da função mitocondrial e aumento da síntese *de novo* e níveis de TGs. Na presença de NAFLD e outros fatores, tais como a inflamação e aumento do estresse oxidativo, provavelmente levam a progressão para NASH, fibrose e necrose. O segundo *hit* é caracterizado pelas adiponectinas que ativam as células e levam a peroxidação lipídica (CASTRO, 2011; KANI et al., 2014). O estresse oxidativo, resultado da patologia é caracterizado pelo desequilíbrio provocado pelo aumento da produção das espécies reativas ao oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (RNS). Nas células, a mitocôndria é a maior fonte de geração de EROs. Vários estudos sugerem que durante a NAFLD caracterizando o segundo hit, a função

mitocondrial está diminuída, devido a alterações ultraestruturais. Essas alterações resultam em uma oxidação-fosforilação defeituosa e uma disfunção na cadeia respiratória gerando um aumento de EROS, levando consequentemente a peroxidação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, membranas celulares, membranas mitocondriais e DNA (BASARANOGU; BASARANOGU; SENTÜRK, 2013; YOON; CHA, 2014). Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), levam ao aumento da produção de citocinas e recrutamento de células inflamatórias para o fígado (MOORE, 2010). Em modelos animais, a progressão da esteatose para a NASH é marcada pelo aumento da peroxidação lipídica (TESSARI et al., 2009). Em pacientes com NASH a elevada ingestão de ácidos graxos saturados foi associada à redução da razão glutatona reduzida/oxidada, evidenciando um efeito pró-oxidante (MACHADO et al., 2008). A redução das vitaminas antioxidantes é associada ao aumento da peroxidação lipídica e estresse oxidativo e pode contribuir para o dano hepatocelular, inflamação e fibrose (LOGUERCIO et al., 2001).

O quadro geralmente é assintomático, na maioria das vezes a patologia é detectada com aumento de enzimas hepáticas, porém esses parâmetros laboratoriais não atingem níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de NAFLD ou diferenciar a NAFLD de outras doenças hepáticas. Causas secundárias também devem ser avaliadas. A histologia permite identificar a presença de inflamação e fibrose e também o grau de infiltração de lipídios no tecido hepático. A ultra-sonografia representa a ferramenta de diagnóstico primário para a esteatose simples, porém a biópsia hepática é o método padrão-ouro para avaliação (GRATTAGLIANO et al., 2007; DIETRICH; HELLERBRANDT, 2014).

O tratamento da doença ainda não está escrito em um guia específico. O tratamento primário é a modificação do estilo de vida, para ambos: prevenção e manutenção geral de saúde para pacientes com NAFLD. Entre as intervenções do estilo de vida, a perda de peso está associada com a melhora do acúmulo de lipídios e da NASH, no entanto, deve ser lenta e gradual. A rápida perda de peso resulta em maior mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo e aumento dos ácidos graxos livres, que pode promover uma maior progressão da doença (ZIVKOVIC; GERMAN; SANYAL, 2007). A restrição calórica é benéfica na perda de peso regular, redução da esteatose e melhora da resistência à insulina (RAHIMI; LANDAVERDE, 2013). Além desses parâmetros, a composição de macronutrientes da dieta tem se

demonstrado tão importante quanto à perda de peso, mais ainda são necessários mais estudos para determinar a exata composição ideal para o tratamento NAFLD (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014).

Evidências sugerem que modificações na ingestão de macronutrientes e diferentes micronutrientes, especialmente antioxidantes foram ligadas ao desenvolvimento e/ou prevenção de NAFLD (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014).

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo testar-se a hipótese da reversão dos danos hepáticos causados pela esteatose hepática não alcoólica avaliado *in vivo*, mediante a modulação lipídica quantitativa da dieta e atividade antioxidante em modelos experimentais.

Figura 1 - Estágios evolutivos doença hepática não alcoólica.

Fig. 1. The progression of NAFLD showing the first and second hits.

Fonte: CASTO; CALDER, 2017.

1.1 Dietas ocidentais e NAFLD

Durante a última década, os hábitos alimentares modificaram para alimentos mais gordurosos e adoçados, conhecidos como dieta ocidental. Apesar dos resultados contraditórios, a proposta é que o excesso de consumo de carboidratos ou ácidos graxos específicos sejam propensos a induzir ou melhorar o quadro patológico (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014)

Em adição a predisposição genética, inatividade física e fatores ambientais, as dietas são reconhecidas como maior causa de obesidade em humanos. O alto consumo de alimentos adicionados de açúcar, com baixa quantidade de nutrientes, alimentos processados e bebidas calóricas são fenômenos relativamente novos. O aumento de bebidas e alimentos ricos em carboidratos simples tem aumentado o

risco de dislipidemia, obesidade, resistência insulina e doenças cardiovasculares (LOZANO et al., 2016).

Em adição o consumo de frutose/ sacarose, a alta ingestão de gorduras, em especial gorduras saturadas tem sido implicada com a patogênese da NAFLD. Muitos investigadores encontraram que a alta ingestão de carboidratos é responsável pelo desenvolvimento da doença, enquanto outros pesquisadores associaram a alta ingestão de gordura (MOUZAKI M; ALLARD, 2012; SHI X, WAHLANG B, WEI X, et al., 2013).

A ligação entre o consumo de açúcares e a implicação em várias doenças crônicas não transmissíveis tem impacto não somente na saúde e como também nas políticas públicas. A organização mundial da saúde recomenda que o consumo de açúcar não deve ultrapassar 5% das calorias diárias. A estimativa do consumo populacional de frutose é difícil de ser realizada isso porque este não é avaliado na maioria das pesquisas ou banco de dados (TAPPY, 2010). A ingestão de frutose no Brasil não está bem definida. De acordo com dados da *International Sugar Organization*, a América do Sul e a Oceania são os maiores consumidores mundiais de açúcar (TAPPY, 2010; INTERNATIONAL SUGAR ORGANIZATION, 2008). Esse alto teor de carboidratos mais comumente na forma de frutose resulta em aumento do estresse oxidativo e resistência à insulina, que são fatores de risco para a NAFLD e diabetes mellitus tipo 2. (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014).

A frutose é usada comercialmente como adoçante (xarope de milho de frutose) para glicose ou sacarose na preparação de sobremesas, condimentos e bebidas gaseificadas (LOZANO et al., 2016). O consumo de frutose tem papel na chave no desenvolvimento de NAFLD, tendo sido reportado no desenvolvimento de esteatose em humanos e roedores (JEGATHEESAN; BANDT, 2017).

A frutose é metabolizada no fígado sendo que as vias de metabolização da frutose e da glicose são diferentes. Sua absorção ocorre por meio de um transportador específico presente nas células intestinais, o GLUT5, o qual aumenta em quantidade de acordo com os níveis dietéticos de frutose; já no fígado sua entrada ocorre pelo transportador GLUT2, sendo este transporte por difusão facilitada e independente de sódio. A frutose é fosforilada pela enzima frutoquinase e tem como produto a frutose-1-fosfato, a qual será convertida em gliceraldeído e dihidroxiacetona fosfato pela cetose-1-fosfato aldolase. Mais da metade da frutose é convertida em glicose, outros 15% convertido em glicogênio, 15 -20% em lactato e

uma pequena parcela em dióxido de carbono. Uma pequena parcela de frutose pode ser convertidos em ácidos graxos estocados na forma de TGs e carregada na circulação sanguínea na forma de VLDL. Essa produção pode ser proveniente da lipogênese de novo (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016).

A ingestão crônica de frutose aumenta a síntese de novo de lipídeos por ativar fatores de transcrição como SREBP1c e ChREBP, como consequência dispara enzimas chaves que regulam a síntese de lipídeos, como ácido graxo sintase e acetilcoa carboxilase, que podem ser demonstrados em roedores submetidos a 60% de frutose por 8 semanas ou com dieta ocidental com 30% de frutose e inibe a secreção de leptina que contribuem para redução da saciedade e aumento da ingestão calórica (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016). Em roedores, a dieta com xarope de milho demonstrou causar hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia (micro e macrovascular), e esteatose hepática (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014). Outros estudos epidemiológicos fazem evidência entre adição de frutose com aumento do ganho de peso e obesidade (RIPPE; ANGELOPOULOS, 2016).

A dieta hiperlipídica (HL+) também é amplamente utilizada para indução da esteatose hepática não alcoólica em modelos experimentais, pois reflete a histopatologia e patofisiologia da NAFLD e NASH observada em humanos (NAKAMURA; TERAUCHI, 2013). Um recente estudo realizado com camundongo C57/BL ofereceu uma dieta hiperlipídica por 16 semanas teve aumento do peso corporal em relação ao controle, esteatose hepática verificada pelo acúmulo de TGs hepático, balonização e corpúsculos de Mallory, aumento dos níveis séricos de glicose e diminuição de adiponectinas, sugerindo uma resistência insulínica. (LAU; YU, 2017).

Um modelo proposto atualmente é a associação de dieta hiperlipídica com maior oferta de frutose, que demonstra afetar o metabolismo lipídico de diferentes maneiras (CRESCENZO, 2014), o que caracteriza de fato a dieta ocidental (rica em frutose e gordura saturada). Encontrados em camundongos C57/BL alimentados com dietas hiperlipídica e rica em frutose sugerem que o consumo da frutose é necessário para a progressão do acúmulo de gordura hepática, fibrogênese, aumentando o peso corporal dos animais e gordura visceral, além da resistência insulínica e esteatose hepática, podendo contribuir para estresse oxidativo (LAU; YU, 2017).

Os ácidos graxos da dieta são capazes de regular várias vias metabólicas envolvidas no metabolismo lipídico principalmente através de uma fina modulação da transcrição de genes de enzimas específicas, podem não somente influenciar na patogênese mais também na prevenção ou reversão das manifestações da esteatose (JUMP, 2011; FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

1.2 MUFAS E PUFAS: Prevenção e tratamento de NAFLD

Os Ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), ômega – 3 e ácidos graxos trans tem papéis diferentes na NAFLD. Alguns estudos têm relacionado doenças cardiovasculares e síndrome metabólica à alteração do metabolismo lipídico e tipo de ácido graxo proveniente da dieta (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014).

O aumento de gordura saturada é usualmente associado com aumento resistência à insulina que pode provocar a progressão da esteatose hepática (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014). O excesso de ácidos graxos saturados aumenta os ácidos graxos livres derivados da lipólise do tecido adiposo branco, reduz o beta-oxidação no fígado e aumenta a lipogênese *de novo*, síntese de novos ácidos graxos através de carboidratos ou proteínas que contribuem para a esteatose hepática (PAGLIALUNGA; DEHN, 2016).

Em contraste aos ácidos graxos saturados, os ácidos graxos poli-insaturados parecem inibir o desenvolvimento da NAFLD. Os PUFAs também parecem inibir a lipogênese *de novo*. Muitos estudos têm demonstrado que os ácidos graxos n-6 e n-3 parecem inibir a lipogênese e o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (SIDDIQUI et al., 2015).

Os PUFAs são classificados de acordo com o número de carbonos, duplas ligações e a posição final da dupla ligação no grupo metila. A família ômega- 3 e ômega – 6 são considerados os mais importantes. O precursor do ômega -3 (alfa linolênico C18:3) e do ômega-6 (ácido linoleico C18:2) não pode ser sintetizados pelo ser humano e são considerados essenciais, provenientes da dieta. São sintetizados pela delta-6- desaturase, primeira enzima e responsável pela taxa de conversão em ômega-6 ou ômega-3. E a delta-5 desaturase responsável pela conversão dos dois PUFAs. Ambas enzimas são expressas no fígado e em outros tecidos (BELLANTI et al, 2017).

O principal ácido graxo n-6 da dieta é o alfa-linoleico sendo este encontrado em diferentes óleos vegetais usados comercialmente, entre eles destaca-se: milho, soja, semente de algodão, gergelim, girassol, canola, entre outros óleos. O produto da soja tem demonstrado resultados positivos sendo considerado um importante componente para o tratamento de NAFLD em modelos animais (RODAS; VENEZUELA; VIDELA, 2015).

O óleo de canola é caracterizado pelos baixos níveis de ácidos graxos saturados (7%), quantidade substancial de MUFAs e PUFA, incluindo 11% de ácido linolênico. Os ácidos graxos de cadeia longa n-3 (PUFAs) são incorporados pelos fosfolipídeos da membrana celular podendo alterar sinalização celular, sensibilidade insulínica e expressão gênica. No fígado os ácidos graxos n-3 estimulam a β -oxidação e diminui a lipogênese. No tecido adiposo, eles aumentam a mobilização e reduzem o estoque de gordura através da ativação do receptor do PPAR- γ (CASTRO et al, 2015). Vários estudos têm demonstrado os benefícios do óleo de canola em relação a parâmetros séricos e hepáticos (LIN et al, 2013).

Os MUFAs são encontrados principalmente nas castanhas, abacate e óleos vegetais (canola e oliva). Em um estudo em modelo animal com NAFLD demonstrou que o consumo do azeite de oliva diminuiu significativamente os níveis de triacilgliceróis hepáticos, onde tem sido sugerido que o azeite pode melhorar a resistência insulínica, aumentar a secreção de TG hepático, como VLDL e diminuir o fluxo lipolítico do tecido adiposo periférico de volta para o fígado. De modo geral, em estudos animais, o azeite fornece uma proteção na esteatose hepática. Em humanos, a sugestão seria que o azeite de oliva, incluso na dieta de pacientes com NAFLD diminuiria a resistência insulina e os TG séricos por aumentar a expressão de enzimas da β -oxidação, ou seja, ativa a PPAR- α , aumento assim a oxidação de ácidos graxos ou reduz a ativação da SREBP e inibindo a lipogênese. Dietas ricas em MUFAs ativam PPAR- α e PPAR γ , aumentando a oxidação lipídica, diminuindo resistência insulínica e consequentemente diminuindo a esteatose hepática (PRIORE et al, 2015). Já outros estudos realizados em roedores mostram que o azeite extra virgem é capaz de induzir o acúmulo de gordura hepática (PRIORE et al. 2015).

Siddiqui et al. 2015 comparou em seu estudo diferentes formulações lipídicas provenientes do óleo de soja (n-6), óleo de peixe (n-3); n-9 (azeite extra virgem, óleo de macadâmia, castanha) e n-7 (óleo de noz moscada) em camundongos C57/BL

que receberam uma dieta rica em sacarose/frutose. Os resultados sugerem uma diminuição da lipogênese e da esteatose hepática e demonstra a importância do estudo com diferentes formulações lipídicas.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que nas últimas décadas devido ao aumento do consumo de alimentos industrializados, rico em frutose e gorduras saturadas são cada vez mais relacionados às causas crescentes de doenças hepáticas, mortalidade e morbidades ligadas a moléstias do fígado em especial a doença hepática não alcoólica, na qual tem despertado grande interesse na pesquisa, pois sua incidência também se correlaciona com a obesidade e comorbidades vinculadas a esta, tais como hipertensão arterial, dislipidemias, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus sendo que tal evidência tem levado a fenômenos biológicos, conhecido como estresse oxidativo. Tais fatos têm ganhado atenção em políticas de Saúde Pública e na pesquisa.

Em decorrência do processo de transição nutricional a obesidade e comorbidades relacionadas surgem como uma importante variável que contribui para o comprometimento do estado nutricional da população. As mudanças nos padrões dietéticos envolvem alterações quantitativas e qualitativas na dieta com elevado conteúdo energético, maior participação de gorduras e açúcares de adição, crescimento no consumo de gordura saturada e redução no consumo de fibra dietética, frutas, hortaliças e cereais. Os açúcares de adição como a frutose, mais comumente encontrada na forma de xarope tem ganhado destaque na indústria alimentícia devido a seu baixo custo e o alto consumo de refrigerantes e bebidas açucaradas tem sido aumentada principalmente na fase de transição, segundo Pesquisas Orçamentos Familiares, no Brasil. Como exemplo temos que de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 os produtos que apresentaram aumento de suas quantidades *per capita* médias adquiridas entre os períodos de realização das POFs nacionais (2002/2003 – 2008/2009) destaca-se o refrigerante de cola (39,3%). Considerando-se a situação do domicílio, na área rural, esse aumento foi ainda mais expressivo. A quantidade média adquirida do refrigerante de cola passou de 3,2 kg para 6,1 kg, representando aumento de 92% no período considerado.

Diante das evidências apresentadas na literatura, é possível considerar terapias voltadas à modulação quantitativa da dieta como método de prevenção ou redução do grau *in vivo* portadores de NAFLD, levando a atenuação no dano hepático, com consequente melhora da função hepática e no metabolismo de

lipídeos, retardando a progressão da NAFLD e atenuando os efeitos do estresse oxidativo.

Tendo em vista a dificuldade do diagnóstico da NAFLD, que incluem a ausência de sinais e sintomas, a baixa sensibilidade das enzimas hepáticas como indicadores da doença e a questionável necessidade de biópsia como padrão ouro para o diagnóstico, estudos em modelos experimentais para análises hepáticas e séricas poderiam se prestar de forma adequada para investigação do efeito de modulação da dieta na patologia desenvolvida.

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo através da modulação lipídica da dieta com MUFAS e PUFAS testar-se da hipótese de reversão ou redução em modelo *in vivo* das formas mais graves de NAFLD em modelos experimentais de esteatose.

A partir dos resultados do presente estudo, espera-se contribuir para a consolidação do conceito de que a modulação lipídica quantitativa da dieta de baixo custo seja um alvo terapêutico relevante na NAFLD e que os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados possam se associar à efeitos clínicos benéficos nesta população de pacientes. Tais evidências demandariam a condução de estudo clínica especialmente desenhada para confirmar tal hipótese em humanos.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos de diferentes óleos vegetais incorporados á dieta em parâmetros do metabolismo lipídico hepático e sérico, estresse oxidativo, resistência à insulina em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose.

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o peso e ingestão alimentar ao longo das semanas experimentais
- II. Verificar alterações nos parâmetros bioquímicos séricos e hepáticos;
- III. Determinar o perfil dos ácidos graxos hepáticos nos diferentes grupos experimentais
- IV. Avaliar o estresse oxidativo e o dano hepático nos animais submetidos aos diferentes tratamentos experimentais
- V. Análise histopatológica para caracterização do grau de morfologia da patogênese

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 2015/217. O desenvolvimento do projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP com a colaboração do Laboratório de Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

4.1 Animais

Foram utilizados 50 camundongos machos C57/BL com peso aproximado de 20g mantidos em alojamento climatizado no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com livre acesso a água e ração, submetidos a ritmo de 12 horas de luz/sombra e temperatura mantida a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram separados em 5 grupos de acordo com delineamento experimental.

4.2 Delineamento experimental

Os grupos experimentais, com o respectivo número de animais por grupo, foram:

1. **Grupo controle (CT, n=10):** Dieta AIN – 93 com 7% de óleo de Soja
2. **Grupo hiperlipídica + frutose (HLF, n=10):** Dieta com 50% de gordura saturada (banha de porco) e 20,25% de Frutose;
3. **Grupo hiperlipídica + frutose + azeite (HLF/AZ; n=10):** Dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) e 25% de Azeite Extra Virgem e 20,25% de Frutose;
4. **Grupo hiperlipídica + frutose + canola (HLF/CN, n=10):** Dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) e 25% de óleo de Canola e 20,25% de Frutose;
5. **Grupo hiperlipídica + frutose + soja (HLF/S, n=10):** Dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) e 25% de óleo de soja e 20,25% de Frutose;

Inicialmente os animais tiveram um período de adaptação às dietas, no qual as dietas experimentais foram misturadas com a dieta controle inicialmente na proporção 1:1 (experimental: controle) por 7 dias e posteriormente na proporção 2:1, por mais 7 dias. As respectivas dietas experimentais foram administradas por 14 semanas.

Os animais foram separados em 2 animais/caixa e as dietas foram ofertadas em recipientes individuais de inox. A quantidade consumida foi aferida três vezes por semana, e após estas pesagens a dieta foi repostada, deixando sempre quantidade suficiente disponível.

As dietas utilizadas são baseadas no preconizado pelo *American Institute of Nutrition*, para a alimentação de roedores em fase de crescimento, (REEVES, NIELSEN et al., 1993), sendo que o amido e a sacarose foram substituídos pela frutose totalizando 20,25 % em todos os grupos estudados. As dietas estão descritas na tabela 1.

Os óleos vegetais utilizados foram adquiridos em comércio local sendo o azeite extra virgem (@gallo); óleo de soja e canola (@Liza).

Ao final do experimento os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com quetamina e xilazina na dosagem de 1 ml dos respectivos anestésicos para 10 ml de salina e foi aplicado na dosagem de 10 µl para 1 g de peso do animal. O sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi deixado em temperatura ambiente por 30 minutos e logo em seguida foi centrifugado a 3500 rpm à 4°C durante por 10 minutos para retirada do soro. O fígado, tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram pesados em balança de precisão e congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -40°C para posteriores análises bioquímicas. O fragmento utilizado para a análise histopatológica foi armazenado em formol tamponado a 10 % para as posteriores análises.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais/ 100g da dieta.

Ingredientes	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Caseína	20	20	20	20	20
Amido	52,9	0	0	0	0
Sacarose	10	0	0	0	0
Frutose	0	20,25	20,25	20,25	20,25
Banha	0	50	25	25	25
Azeite	0	0	25	0	0
Óleo de canola	0	0	0	25	0
Óleo de soja	7	0	0	0	25
Fibra	5	5	5	5	5
Mix Vitaminas	1	1	1	1	1
Mix Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
L- Cisteína	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Macronutrientes (%)					
Carboidratos	62,9	20,25	20,25	20,25	20,25
Proteínas	20	20	20	20	20
Lipídeos	7	50	50	50	50
Kcal/100 g	394,6	611	611	611	611
kcal/g	3,9	6,1	6,1	6,1	6,1

BHT - di-terc-butil metil fenol. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50 % de banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja).

FONTE: (REEVES, NIELSEN et al., 1993).

4.3 Peso dos animais

Os animais foram pesados três vezes por semana durante todo o experimento. Foi calculada a média de peso semanal dos animais a partir da média do 3 dias.

4.4 Ingestão alimentar, Ingestão energética e taxa de eficiência da dieta

As dietas foram preparadas semanalmente e ofertadas em recipientes de inox. A quantidade consumida foi aferida três vezes por semana no mesmo horário e

após estas pesagens a dieta foi repostada, deixando sempre quantidade suficiente disponível. Foi calculada a média de consumo semanal a partir de 3 dias de aferição. O cálculo de ingestão energética foi calculado a partir da dieta ofertada. A TED expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso e é calculada de acordo com a fórmula apresentada abaixo (KANG; AHN; LEE, 2005):

$$\text{TED} = [\text{média ganho de peso diário (g)} / \text{média de consumo de dieta diário (g)}]$$

4.5 Cálculos do índice de peroxidabilidade dos óleos vegetais e da banha de porco utilizados nas dietas experimentais

O índice de peroxidabilidade (IP) da dieta foi calculado conforme descreve Pamplona et al. (1998) a partir dos dados obtidos na determinação do perfil de ácidos graxos das dietas experimentais, com base no grau de insaturação dos ácidos graxos. A fórmula utilizada para o cálculo é descrita a seguir:

$$\text{IP} = (\% \text{monoenoícos} \times 0,025) + (\% \text{dienoícos} \times 1) + (\% \text{trienoícos} \times 2) + (\% \text{tetraenoícos} \times 4) + (\% \text{pentaenoícos} \times 6) + (\% \text{hexaenoíco} \times 8)$$

4.6 Análises

4.6.1 Determinação da composição dos Ácidos Graxos da banha de porco, azeite extra virgem, óleo de canola e óleo de soja utilizados no preparo das dietas

Para a análise dos ácidos graxos presentes no óleo de soja, óleo de canola, azeite extra virgem e banha de porco foi necessária uma amostra de 50µl de cada óleo colocadas em tubos com tampa, exceto para banha que utilizamos 25 µl, todas as amostras foram colocadas em um tubo de ensaio de 10 ml. Nessas amostras foram adicionadas 1ml de solução de KOH em metanol (0,5M) com posterior agitação. Os tubos foram colocados em banho a 100°C por 15 minutos. Após resfriar, foi acrescentado 400µl de solução de HCl/Metanol (4:1, v/v), e novamente aquecidos a 100°C por 15 min. Depois de resfriar, foram acrescentados 2ml de água, agitados e a solução foi lavada com 3ml de hexano por duas vezes. A fase orgânica foi filtrada em papel de filtro contendo Na₂SO₄. Essa solução de hexano e ácidos

graxos foi seca em corrente de nitrogênio e ressuspensa em 500µl de clorofórmio e injetado no cromatógrafo gasoso.

Os ácidos graxos foram determinados em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, GC-2014 com auto-injetor AOC-20i, com coluna capilar SP2560 100m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de filme. O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo de 1,6ml/min. As temperaturas do injetor e do detector serão de 250°C. O padrão utilizado para identificação foi composto por uma mistura de ácidos graxos metil-esters da Supelco (Supelco 37 Component FAME MIX) (ANDREOLI et al.,2007).

4.6.2 Determinação de frações lipídicas séricas

O colesterol total, o colesterol presente na lipoproteína HDL (lipoproteína de alta densidade) e os TGs séricos e presentes na HDL foram determinados através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) no soro. Após estas determinações, calculou-se o valor de VLDL. Estes kits também foram utilizados para as dosagens hepáticas.

4.6.3 Determinação de proteína sérica e hepática

A determinação de proteína no fígado e soro foi realizada por kit comercial utilizando o método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Para a análise em fígado, este foi homogeneizado em tampão fosfato e retirada uma alíquota de 10ul e seguido o protocolo do kit.

4.6.4 Determinação de glicemia e razão entre triglicerídeos e HDLcolesterol séricos

A glicemia dos animais foi aferida ao final do experimento. As amostras foram obtidas pela cauda dos animais e os níveis serão mensurados usando teste de glicosímetro freestyle lite abbot®.

A razão triglicerídeos/HDLcolesterol foi calculada como preditor da resistência a insulina, conforme proposto por Fan et al.(2011).

4.6.5 Determinação de gordura hepática total e parâmetros hepáticos

A determinação da gordura hepática total foi realizada de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959) adaptado. Para as análises: 250 mg de tecido hepático foi homogeneizado com 0,4 ml de água destilada, em tubos de 10 mL. Em seguida foi adicionado 1 ml de metanol e 0,5 ml de clorofórmio. Os tubos foram submetidos à agitação em vortex por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 0,5 ml de H₂O e 0,5 ml de clorofórmio. Uma nova agitação foi realizada por aproximadamente 2 minutos, e então os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 2 minutos para separação das camadas de clorofórmio (inferior) e aquosa (superior). Foi retirado aproximadamente 0,65 ml do clorofórmio e colocado em um tubo de ensaio contendo 0,5 g de sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água. Uma alíquota de 0,25 ml da fase de clorofórmio livre de água foi transferida para um béquer previamente pesado, o qual foi levado para uma estufa a 50°C. Após evaporar todo o clorofórmio, repete-se a pesagem do béquer. O Cálculo foi obtido através da diferença das pesagens do béquer, em relação à massa inicial do tecido utilizado. O cálculo foi realizado pela diferença das pesagens do béquer dividido pela massa inicial de tecido utilizado.

A partir da extração de gordura hepática total foram realizadas através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil) as dosagens de parâmetros hepáticos. Foi realizado dosagem de Triglicerídeos, Colesterol e HDL.

4.6.6 Peroxidação lipídica hepática

Esta análise foi feita de acordo com o método proposto por Gerard-Monnier et al., (1998), com algumas adaptações. Para a dosagem de MDA foi pesada uma amostra de 100mg de tecido hepático o qual foi homogeneizado em 1ml de tampão fosfato (fosfato de sódio 0,1M, pH7.0). Desse homogenato foram retirados 100µl e transferidos a um eppendorf. A este foi adicionado 300µl de solução de 10mM de 1-metil-fenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e 75µl de HCL puro (37%). Logo após, os eppendorfs foram agitados em vortex e incubados em banho-maria a 45°C por 40 minutos. Após o banho, houve resfriamento das amostras em gelo e em seguida os eppendorfs foram centrifugados a 4000rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foi feita a leitura de absorbância com comprimento de onda de 586nm.

A concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) hidrolisado.

4.6.7 Determinação da glutathiona reduzida (GSH) hepática

A dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) foi realizada no tecido hepático de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Cerca de 100 mg da amostra do tecido foi homogeneizada em um Potter com 4,0 mL de tampão EDTA (0,02M), sob gelo. Uma alíquota de 2,5 mL deste homogenato foi retirada, para a mistura a 2,0 mL de água deionizada e 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. A reação dura cerca de 15 minutos, posteriormente a amostra foi centrifugada por 15 minutos (4000 rpm a temperatura ambiente). Após a centrifugação foi retirado 1,0 mL do sobrenadante e adicionado 2,0 mL de tampão TRIS (0,4M, pH 8,9) e 0,05 mL de DTNB (ácido ditionitrobenzóico) (0,01M em metanol). A leitura foi feita no comprimento de onda de 412 nm, 5 minutos após a adição do DTNB, contra um branco com EDTA (0,02M) em lugar do sobrenadante. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M).

A glutathiona reduzida sérica foi dosada por meio de uma alíquota de 25 µL de soro com a adição de 1 mL do tampão Tris-EDTA para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412 nm, obtendo-se A1. Posteriormente, 25 µL do DTNB foi adicionado à esta solução e após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, foi realizada a segunda leitura, obtendo-se A2, contra um branco de DTNB. Após a subtração dos valores obtidos A2-A1, a concentração na amostra foi calculada utilizando-se, uma curva padrão de GSH, expressa em mmol/L, conforme método descrito por Costa; Dos Santos; Lima (2006).

4.6.8 Determinação de Vitamina E hepática

As análises hepáticas de vitamina E (α-tocoferol) foram realizadas por HPLC, segundo método adaptado de Arnaud et al (1991). Para as análises foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT; coluna tipo C-18 (150 x 4,6 mm - 5 µm); detector UV-visível modelo SPD-20A; fase móvel composta por acetonitrila:diclorometano:metanol 7:2:1; velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292 nm e para α-tocoferol, respectivamente. As concentrações foram

determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de soro.

Cerca de 200 μL de soro foram homogeneizados com 400 μL mL de etanol absoluto. Posteriormente foi adicionado 400 μL de n-hexano para extração. As amostras sofreram agitação em vórtex por 1 minuto, para posterior centrifugação (3000rpm durante 10 min). O sobrenadante foi retirado, cerca de 200 μL L, e seco ao fluxo de nitrogênio. A ressuspensão do resíduo seco foi realizada com 200 μL da fase móvel e 20 μL foram injetados no cromatógrafo.

4.6.9 Análise histopatológica

As amostras hepáticas foram fixadas em formol tamponado e embebidas em parafina logo em seguida submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação semi-quantitativa de esteatose e/ou esteato-hepatite em 10 campos microscópicos representativos (aumento de 40X), por dois dos autores do presente estudo (CSM e LZR). Todos os resultados divergentes foram analisados discutidos com o uso de um sistema de análise microscópica de co-observador. A análise foi baseada na escala de classificação por meio de escores e definidos de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem esteatose; *Grau 1*: esteatose leve a moderada; *Grau 2*: esteatose moderada a severa; *Grau 3*: esteatose severa. Também foram graduados os seguintes achados histopatológicos: inflamação lobular de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem inflamação lobular; *Grau 1*: inflamação lobular leve à moderada; *Grau 2*: inflamação lobular moderada a severa; *Grau 3*: inflamação lobular severa; inflamação crônica portal, de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem inflamação crônica portal; *Grau 1*: inflamação crônica portal leve à moderada; *Grau 2*: inflamação crônica portal moderada a severa; *Grau 3*: inflamação crônica portal severa; degeneração baloniforme, de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem degeneração; *Grau 1*: degeneração baloniforme leve à moderada; *Grau 2*: degeneração baloniforme moderada a severa; *Grau 3*: degeneração baloniforme severa; fibrose, de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem fibrose; *Grau 1*: fobrose leve à moderada; *Grau 2*: fibrose moderada a severa; *Grau 3*: fibrose severa e; necrose, de acordo com a seguinte pontuação: *Grau 0*; sem necrose; *Grau 1*: necrose leve à moderada; *Grau 2*: necrose moderada a severa; *Grau 3*: necrose severa (BRUNT et al., 2011).

4.6.10 Determinação de ácidos graxos hepáticos

Para determinação de ácidos graxos hepáticos, foi utilizado o método de cromatografia gasosa conforme proposto por Lewis *et al.* (32).

Em um tubo de vidro com tampa, foi colocado 500mg de fígado e acrescentados metanol, HCl e clorofórmio (10/1/1, v/v). A solução foi homogeneizada e aquecida a 90°C por 90 minutos. Após esfriar, adicionou-se 1ml de água destilada, 2ml da mistura hexano/clorofórmio (4/1, v/v), homogeneizado e centrifugado. Em seguida, a camada superior foi retirada e transferida a um frasco. Essa lavagem com a solução de hexano/clorofórmio foi repetida por mais duas vezes com tempo de centrifugação de 5 minutos. A solução no frasco foi seca em corrente de nitrogênio e ressuspensa em 200µl de clorofórmio para ser injetada no cromatógrafo gasoso sob as mesmas condições descritas na determinação de ácidos graxos das dietas.

4.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados em valores de média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Tukey foram utilizados para possíveis diferenças com relação aos grupos. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para $P \leq 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Composição percentual de ácidos graxos da banha e dos óleos vegetais utilizados para o preparo das dietas no experimento (%)

A banha de porco é rica em ácido oleico, principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados. Tem alto teor de ácidos graxos saturados, principalmente o mirístico (C14:0), o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0) e por fim rica em ácidos graxos poli-insaturados, com maior quantidade de ômega-6.

O azeite extra virgem tem uma alta quantidade de ácidos graxos saturados sendo principalmente o palmítico e o esteárico e confirma o esperado sendo rico em MUFAs, principalmente o ácido oleico (ômega-9), seguido de PUFA's (n-6).

O óleo de canola é rico em MUFAs, principalmente o ácido oleico (n-9) maior quantidade de ácido oleico seguido de PUFA's, em maior quantidade o ômega-6 seguido do ômega-3, rico em EPA e DHA. O óleo de soja apresenta baixa quantidade de ácidos graxos saturados, apresenta uma alta quantidade de n-6 e n-9 e rico principalmente em PUFA's ômega-6 seguido de MUFAs (ômega-9). Apresenta uma quantidade considerável de ômega-3 e baixa quantidade de DHA.

Em relação à razão n6/n3 foi maior no HLF/S seguida da banha de porco. O azeite extra virgem e o óleo de canola apresentaram menor relação n6/n3, o azeite por ambos possuir uma maior quantidade de MUFAs e o óleo de canola por possuir uma maior quantidade de ômega-3.

A razão AGS/PUFA's foi maior no grupo que recebeu banha de porco, seguida do azeite, canola e soja.

Os dados estão representados na tabela 2.

Tabela 2 - Composição percentual da banha e óleos vegetais comerciais utilizados neste estudo.

Estrutura	BA	AZ	CN	S
Ácidos graxos saturados				
C4:0	0,135	0,160	0,111	0,116
C6:0	0,006	0,032	0,008	0,013
C8:0	nd	0,002	0,002	0,001
C10:0	0,068	0,003	0,015	0,000
C11:0	0,021	0,027	0,013	0,002
C12:0	0,089	0,003	0,020	0,007
C13:0	0,000	0,008	0,009	0,009
C14:0	1,418	0,019	0,074	0,006
C15:0	0,060	0,029	0,018	0,036
C16:0	23,860	9,532	4,502	0,008
C17:0	0,336	0,074	0,086	0,080
C18:0	10,886	2,850	2,290	0,357
Σ AGS	36,878	12,738	7,148	0,636
Ácidos graxos MUFAs				
C16:1	1,962	0,750	0,293	11,565
C18:1n9c	36,924	69,818	60,007	23,153
C20:1n9	0,027	0,207	1,049	0,117
C22:1n9	0,024	0,186	0,028	0,028
Σ MUFAs	38,938	70,961	61,377	34,863
Ácidos graxos PUFAs				
C18:2n6c	20,688	6,565	19,729	57,519
C18:3n6	0,055	3,475	0,826	0,000
C18:3n3	1,042	1,136	8,018	5,199
C20:2	0,117	0,000	0,041	0,035
C20:3n6	0,137	0,014	0,016	0,024
C20:3n3	0,997	2,732	1,111	0,596
C20:4n6	0,070	0,092	0,051	0,012
C20:5n3	0,016	0,096	0,332	0,422
C22:2	0,017	0,000	0,000	0,000
C22:6n-3	0,100	0,075	0,035	0,010
Σ PUFAs	23,241	14,185	30,159	63,818
N-6	20,951	10,146	20,622	57,555
N-3	3,197	4,053	9,511	6,252
Razão n-6/n-3	6,553	2,503	2,168	9,205
Razão AGS/PUFAs	1,59	0,90	0,24	0,01

Perfil de ácidos graxos dos respectivos tratamentos. BA: banha de porco; Az: Azeite extra virgem; CN: óleo de canola; S: óleo de soja; Σ: somatória; AGS: ácidos graxos saturados MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados; n-3: ácidos graxos ômega-3; n-6: ácidos graxos ômega-6; ND: Não identificado;

5.2 Índice de peroxidabilidade da banha de porco e dos respectivos óleos vegetais comerciais utilizados no experimento

O índice de peroxidabilidade dos óleos de vegetais e da gordura animal e das respectivas dietas utilizadas são apresentados na tabela 3.e 4.

O cálculo do IP é realizado de acordo com o grau de insaturações dos ácidos graxos. O óleo de soja é rico em PUFA's, especialmente ômega-6 o que contribui para o elevado índice de peroxidabilidade. O óleo de canola é composto por elevado percentual de PUFA's, rico em ALA em EPA e DHA, o que contribuiu para o elevado índice de peroxidabilidade encontrado. A gordura animal apresentou baixo IP provavelmente por apresentar elevado percentual de ácidos graxos saturados.

Tabela 3 - Índice de Peroxidabilidade (IP) dos óleos e da gordura utilizados na dieta.

	Banha de porco	Azeite extra virgem	Óleo de canola	óleo de Soja
IP	64,52	89,52	94,71	101,6

Índice de peroxidabilidade da gordura animal sem tratamento térmico. $IP = (\% \text{ monoenólicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienólicos} \times 1) + (\% \text{ trienólicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenólicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenólicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenólicos} \times 8)$.

Tabela 4 - Índice de Peroxidabilidade (IP) das dietas utilizadas no presente estudo.

	Banha de porco	Azeite extra virgem	Óleo de canola	óleo de Soja
IP	64,52	77	79,6	83

Índice de peroxidabilidade da gordura animal sem tratamento térmico. $IP = (\% \text{ monoenólicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienólicos} \times 1) + (\% \text{ trienólicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenólicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenólicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenólicos} \times 8)$.

5.3 Peso dos animais

Na figura 2 estão representados os pesos dos grupos ao longo das 16 semanas experimentais. Durante a primeira semana de adaptação o grupo HLF/AZ apresentou um maior peso em relação ao grupo HLF/S ($p < 0,01$). Da segunda até a quarta semana não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao peso corporal. A partir da quinta até a oitava semana há um aumento expressivo do peso dos animais do grupo HLF em relação ao CT ($P < 0,05$). A partir da nona semana o grupo HLF apresentou uma

diferença de peso maior em relação aos grupos CT ($p < 0,001$), HLF/AZ ($p < 0,01$), HLF/CN ($p < 0,01$) e HLF/S ($p < 0,01$) até a décima sexta semana, podendo concluir que os animais tratados com os respectivos óleos mantiveram um ganho de peso gradual e homogêneo similar ao controle e o grupo HLF na qual apresentou um aumento de peso significativo em relação aos demais grupos. O Cálculo do ganho de peso (Δ) também evidencia um maior ganho de peso do grupo HLF em relação aos grupos experimentais (tabela 5). Todos os dados de peso semanal estão representados no apêndice A.

Figura 2 - Evolução do peso semanal dos animais ao longo das 16 semanas experimentais.

Figura 2 - Evolução semanal do peso dos animais (gramas). Os pontos representam valores médios de peso, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios- padrões. * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN + frutose - (25% de banha + 25% de canola); HLF/S - + frutose (25% de banha + 25% de soja)

Tabela 5 - Peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais durante o experimento (g).

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Peso inicial (g)	20,30±1,70 ^{a,b}	20,60±1,17 ^a	21,00±1,33 ^{a,b}	19,50±1,08 ^{a,b}	18,75±1,48 ^b
Peso final (g)	34,70±3,43 ^a	44,10±5,66 ^b	35,20±4,54 ^a	35,80±4,11 ^a	36,76±6,29 ^a
Δ ganho de peso(g)	14,40±3,20 ^a	23,50±5,48 ^b	14,20±4,02 ^a	16,30±3,59 ^a	18,00±6,92 ^{a,b}

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.4 Ingestão alimentar, ingestão energética e taxa de eficiência da dieta (TED)

Na figura 3 estão representados os dados de média $\pm$ desvio padrão sobre a ingestão alimentar semanal dos animais durante o experimento, obtidos por uma média de 3 dias de consumo. Na primeira semana de adaptação o grupo HLF/AZ apresentou uma maior ingestão em relação ao HLF/CN ($p < 0,05$). Na segunda semana de adaptação o grupo HLF/AZ apresentou uma maior ingestão em relação ao CT, HLF/CN e HLF/S ($p < 0,05$). A partir da terceira semana com a introdução da dieta experimental com 50% dos respectivos óleos e da banha o grupo HLF diminui significativamente a ingestão alimentar em relação ao HLF/AZ ($p < 0,01$). Na quarta semana o grupo CT e HLF/AZ apresentou uma maior ingestão em relação ao HLF/S ($p < 0,05$). Na quinta semana o HLF/AZ apresentou uma maior ingestão em relação ao CT ($p < 0,01$) e em relação ao HLF ($p < 0,001$). Na sexta semana controle apresentou uma maior ingestão em relação aos grupos HLF ($p < 0,001$); HLF/AZ ($p < 0,01$); HLF/CN ($p < 0,001$); HLF/S ($p < 0,001$), enquanto o HLF apresentou uma menor ingestão em relação ao HLF/AZ e HLF/S ($p < 0,001$). Da sétima até a décima semana o grupo controle apresentou um aumento significativo da ingestão em relação aos grupos experimentais HLF; HLF/AZ; HLF/CN e HLF/S ($p < 0,001$) enquanto o grupo HLF diminui significativamente em relação ao HLF/AZ; HLF/CN e HLF/S ($P < 0,01$). Na décima primeira CT ainda apresenta uma maior ingestão em relação aos grupos HLF; HLF/AZ; HLF/CN; HLF/S ($p < 0,001$), enquanto que o grupo HLF apresenta apenas diferença significativa de ingestão em relação ao HLF/AZ e HLF/CN ($p < 0,01$). Na décima segunda semana o CT apresenta uma maior ingestão em relação ao HLF; HLF/CN; HLF/S ($p < 0,001$) para todos, enquanto que o HLF apresenta uma menor ingestão em relação ao HLF/CN ($p < 0,01$) e HLF/AZ ($p < 0,001$) e O HLF/AZ apresenta uma maior ingestão em relação ao HLF; HLF/CN e HLF/S ($p < 0,01$). Na décima terceira até décima quinta semana o CT continua com ingestão aumentada em relação aos outros grupos experimentais ($p < 0,001$) e o HLF/AZ uma maior ingestão em relação ao HLF/S ($p < 0,01$). Na décima sexta semana experimental os grupos mantêm a mesma ingestão alimentar. Em resumo, houve variações em relação à ingestão alimentar ao longo de todo experimento, sendo que o controle apresentou uma maior ingestão alimentar e o HLF uma menor ingestão alimentar. Entre os tratados o HLF/AZ apresentou uma maior ingestão ao longo de todo experimento.

Os dados de ingestão alimentar (gramas/semana) relacionam-se positivamente com os dados de ingestão energética (kcal/dia).

As dietas experimentais com os respectivos óleos utilizados eram hipercalóricas quando comparadas com o grupo controle que recebeu AIN 93 para crescimento.

Em relação à ingestão energética (kcal/dia) houve diferença significativa entre o CT e todos os grupos experimentais ($p < 0,001$) onde o CT apresentou uma menor ingestão energética em relação aos grupos. O HLF/AZ apresentou uma maior ingestão energética comparada a HLF ($p < 0,001$); HLF/CN ($p < 0,01$) e HLF/S ($p < 0,05$). O HLF apresentou uma menor ingestão comparada ao HLF/S ($p < 0,05$). O grupo azeite apresentou uma maior ingestão energética. Os dados de ingestão energética semanal estão representados na figura 4 e os dados de ingestão diária estão representados na tabela 6.

A taxa da eficiência da dieta, que expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso, foi maior nos grupos HLF comparado com CT. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Os dados estão representados na tabela 6.

Figura 3 - Ingestão alimentar ao longo do período experimental (g).

Figura 3 - Evolução semanal de ingestão alimentar (Média gramas/dia). Os pontos representam valores médios da ingestão alimentar semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja). Dados foram expressos média $\pm$ desvio-padrão por 16 semanas. * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Figura 4 - Ingestão energética ao longo do período experimental (kcal/semana).

Figura 4 - Evolução semanal de ingestão energética (kcal/semana). Os pontos representam valores médios da ingestão alimentar semanal, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% de banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica (25% de banha + 25% de azeite) + frutose; HLF/CN – (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S – (25% de banha + 25% de soja) + frutose. Dados foram expressos média $\pm$ desvio-padrão por 16 semanas. * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Tabela 6 - Ingestão Diária (g/dia), Ingestão Energética Diária (Kcal/dia) e Taxa de Eficiência da Dieta (TED).

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Ingestão diária (g/dia)	3,48±0,18 ^a	2,62±0,21 ^{b,c}	3,18±0,29 ^b	2,83±0,14 ^c	2,90±0,16 ^{b,c}
Ingestão energética (kcal/dia)	13,78±0,77 ^a	15,98±1,15 ^b	19,48±1,86 ^c	17,43±0,83 ^{b,d}	17,69±1,21 ^{d,e}
Taxa de eficiência da dieta (TED)	0,025±0,07 ^a	0,055±0,04 ^b	0,033±0,01 ^{a,b}	0,039 ± 0,01 ^{a,b}	0,054±0,01 ^{a,b}

Resultados expressos em média ± DP. ^{a,b,c,d,e}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica +frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.5 Pesos do tecido hepático, peso tecido adiposo epididimal e retroperitoneal e razões em relação ao peso corporal

Em relação aos pesos dos tecidos, o grupo HLF apresentou uma maior média de peso hepático comparado ao grupo CT e HLF/S ($p < 0,05$, para ambos), embora a média tenha sido menor também nos outros grupos tratados. A razão peso hepático/peso corporal não apresentou diferença significativa entre os grupos. Não houve diferença significativa em relação ao tecido adiposo epididimal e entre a razão tecido adiposo epididimal/peso corporal entre os grupos apresentados. O grupo HLF apresentou uma maior média em relação ao tecido adiposo retroperitoneal em relação ao CT e HLF/CN ($p < 0,05$, para ambos), porém quando o tecido adiposo retroperitoneal é ajustado para o peso corporal não existe diferença significativa entre os grupos experimentais, embora o CT e HLF/CN apresentem uma menor média em relação aos demais. Em relação à soma dos tecidos adiposos (epididimal + retroperitoneal) o grupo HLF apresentou uma maior média em relação CT ($p < 0,05$), quando ajustado ao peso corporal não houve alteração significativa.

Tabela 7 - Peso hepático, peso tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, somatória e razões em relação ao peso corporal (g).

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Pesos Fígado (g)	1,25±0,20 ^a	1,73±0,51 ^b	1,35±0,22 ^{a,b}	1,38±0,23 ^{a,b}	1,28±0,35 ^a
Razão peso hepático/peso corporal (%)	3,5±0,38	3,8±0,73	3,8±0,62	3,8±0,32	3,4±0,44
Tecido adiposo epididimal (g)	1,39±0,47	2,15±0,41	1,63±0,71	1,57±0,51	1,84±0,86
Razão tecido adiposo epididimal/peso corporal (%)	3,99 ± 1,17	4,92±1,07	4,49±1,75	4,29±1,08	4,89±1,77
Retroperiotinial (g)	0,35±0,09 ^a	0,56±0,13 ^b	0,41±0,20 ^{a,b}	0,36±0,12 ^a	0,43±0,18 ^{a,b}
Razão tecido adiposo retro/peso corporal (%)	1,00±0,19	1,27±0,30	1,16±0,53	1,00±0,27	1,15±0,40
Soma Tec. Adiposos (g)	1,75±0,54 ^a	2,71±0,52 ^b	2,04±0,89 ^{a,b}	1,94±0,62 ^{a,b}	2,27±1,07 ^{a,b}
Soma Tec. Adiposos/peso corporal (%)	4,99±1,31	6,19±1,31	5,65±2,21	5,30±1,32	6,05±2,14

Resultados expressos em média ± DP. ^{a,b}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.6 Parâmetros séricos: Triglicerídeos, Lipoproteína de Muito Baixa Densidade, Colesterol Total e Lipoproteína de Alta Densidade Séricos

O grupo HLF/S apresentou uma menor quantidade de TGs séricos comparados ao controle ($p<0,01$). Entre os tratados, o HLF/AZ apresentou uma maior quantidade de TGs séricos comparados aos outros grupos tratados que receberam a dieta hiperlipídica HLF ($p<0,05$); HLF/CN ($p<0,05$); HLF/S ($p<0,001$). O mesmo ocorreu para a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Os níveis de colesterol total sérico foram elevados no grupo HLF/S quando comparado ao CT ($p<0,01$) e HLF/AZ ($p<0,05$).

Em relação ao HDL colesterol os grupos HLF e HLF/AZ apresentaram uma maior média em relação ao CT ($p<0,01$). E o HLF e HLF/AZ apresentaram também uma maior média em relação ao HLF/S ($p<0,05$).

Tabela 8 - Valores médios de triacilgliceróis, lipoproteína de muito baixa densidade, colesterol total e lipoproteína de alta densidade séricos.

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Triacilgliceróis(mmol/l)	0,25±0,06 ^{a,b}	0,21±0,02 ^{a,c}	0,29±0,04 ^b	0,22±0,05 ^{a,c}	0,16±0,03 ^c
VLDL (mmol/l)	0,05±0,01 ^{a,b}	0,04±0,05 ^{a,c}	0,05±0,01 ^b	0,04±0,01 ^{a,c}	0,03±0,05 ^c
Colesterol (mmol/l)	2,80±0,59 ^{a,b}	3,60±0,59 ^{a,b,c}	2,92±0,73 ^{a,b}	3,23±1,03 ^{a,b,c}	4,20±1,10 ^c
HDL c (mmol/l)	1,45±0,32 ^a	2,17±0,42 ^b	2,17±0,62 ^b	1,60±0,45 ^{a,b}	1,46±0,34 ^a

Resultados expressos em média ± DP. ^{a,b,c}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P<0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S - grupo hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de soja);

Figura 5 - Valores médios de triglicerídeos, lipoproteína de muito baixa densidade, colesterol total e lipoproteína de alta densidade séricos.

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b,c}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica (25% de banha + 25% de azeite) + frutose; HLF/CN – (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S – (25% de banha + 25% de soja) + frutose;

5.7 Glicemia e Razão Triacilgliceróis/ HDL colesterol

Em relação à glicemia e a razão TG/HDL colesterol não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Tabela 9 - Valores médios de glicemia e razão triacilgliceróis/HDL.

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Glicemia (mmol/l)	20,09 $\pm$ 4,80	20,20 $\pm$ 4,20	21,97 $\pm$ 4,13	19,34 $\pm$ 4,07	18,60 $\pm$ 4,14
TC/HDLcolesterol	0,15 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,03

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

Figura 6 - Glicemia e razão triacilgliceróis/HDL colesterol.

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.8 Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

A peroxidação lipídica foi analisada através do MDA presente no tecido hepático. Os grupos tratados HLF ($p < 0,05$); HLF/AZ ($p < 0,01$); HLF/CN e HLF/S ($p < 0,001$) apresentaram uma maior média de peroxidação lipídica em relação ao controle. O grupo HLF/CN O HLF apresentou uma maior média quando comparado com HLF ($p < 0,05$). Em relação ao estresse oxidativo o grupo HLF/CN apresentou um maior quantidade de MDA hepático. Relacionando com os parâmetros antioxidantes, os grupos tratados HLF/CN e HLF/S apresentaram uma maior média de GSH hepático em relação ao CT ($p < 0,001$, ambos). HLF e HLF/AZ apresentaram uma menor média de GSH hepático quando comparados ao HLF/CN e HLF/S ($p < 0,001$). Para a vitamina E houve apenas diferença estatística entre o CT e os grupos experimentais, onde os grupos experimentais apresentaram uma menor média de α Tocoferol em relação ao controle ($P < 0,001$). Os dados estão representados na tabela 10 e na figura 7.

Tabela 10 - Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E nos diferentes grupos experimentais.

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
MDA Hepático (mmol/ g PTN)	0,77±0,37 ^a	2,21±0,96 ^b	2,80±0,36 ^{b,c}	3,61±1,79 ^{c,d}	3,12±1,18 ^{b,c}
GSH hepático (mmol/ g PTN)	0,85±0,34 ^a	1,12±0,27 ^{a,c}	1,19±0,32 ^a	3,80±1,98 ^b	4,25±1,62 ^b
Vitamina E hepática (nmoles/g T)	148±83,7 ^a	64,8±10,7 ^b	84,5±26,5 ^b	66,2±22,0 ^b	54,9±9,1 ^b

Resultados expressos em média ± DP^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

Figura 7 - Valores hepáticos de MDA, GSH e Vitamina E nos diferentes grupos experimentais.

Resultados expressos em média ± DP^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.9 Gordura hepática total, Triglicerídeos e Colesterol hepáticos

Em relação à gordura hepática total houve um maior acúmulo de gordura hepática no grupo HLF comparado com o CT ($p < 0,01$) e entre os tratados o HLF/CN apresentou um menor acúmulo de gordura em relação ao HLF ($p < 0,01$). O grupo HLF também apresentou um maior acúmulo de TGs em relação ao CT ($p < 0,01$), embora os grupos tratados também apresentem uma redução do TGs estes não apresentarem diferenças estatísticas significativas. Para o colesterol hepático total não houve diferença significativa entre os grupos apresentados. Os dados estão representados na tabela 11 e na figura 8.

Tabela 11 - Gordura hepática total, triacilgliceróis e colesterol hepáticos.

	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Gordura hepática total (gG/ g tecido)	0,14±0,04 ^a	0,26±0,09 ^b	0,17±0,06 ^{a,b}	0,15±0,06 ^a	0,16±0,06 ^{a,b}
Triacilgliceróis (mmol/ g T)	0,019±0,006 ^a	0,043±0,019 ^b	0,027±0,010 ^{a,b}	0,027±0,012 ^{a,b}	0,028±0,018 ^{a,b}
Colesterol total (nmol/ g T)	5,639±0,911	5,704±0,716	5,801±1,414	5,153±0,133	4,888±0,978

Resultados expressos em média $\pm$ DP^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

Figura 8 - Gordura hepática total, triglicerídeos e colesterol hepáticos.

Resultados expressos em média $\pm$ DP^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja);

5.10 Histologia hepática

Os fígados foram corados com eosina e hematoxilina para a avaliação de esteatose hepática, balonização e inflamação. Todos os resultados divergentes foram analisados e discutidos com o uso do sistema de análise microscópica de co-observador, com avaliação semi-quantitativa. A figura 9 representa a microfotografia no aumento de 40 x. Nenhum grupo apresentou inflamação ou balonização.

Figura 9 - Microfotografias mostrando aspectos histológicos de tecido hepático de animais do grupo Controle (A) - Fígado normal, sem evidência de esteatose, inflamação, fibrose. (B)- grupo HLF: Fígado com esteatose microvesicular difusa de moderada a severa, sem inflamação e sem fibrose; (C) - grupo HLF/AZ: esteatose macrovesicular e microvesicular de leve a moderada, sem inflamação e sem fibrose; (D) – grupo HLF/CN: esteatose macrovesicular leve, sem inflamação e sem fibrose; (E) – grupo HLF/S: esteatose macrovesicular leve, sem inflamação e sem fibrose. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN;- hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de canola) HLF/S - hiperlipídica+ frutose (25% de banha + 25% de soja);

Tabela 12 - Avaliação do score de esteatose hepática não alcóolica.

Avaliação do score de esteatose hepática não alcóolica					
Grau esteatose score (0-3)	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
0	5*	1	1	6	5
1	5	2	5	2	1
2	0	2	3	2	0
3	0	5	1	0	2

Avaliação do grau de esteatose, inflamação e balonização. CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de soja); * Número de animais por score apresentado.

Figura 10 - Avaliação do escore de esteatose hepática nos grupos estudados.

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite); HLF/CN - grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de canola); HLF/S grupo hiperlipídica + frutose - (25% de banha + 25% de soja);

5.11 Perfil de ácidos graxos hepáticos

Em relação aos ácidos graxos saturados o ácido mirísitico (14:0) foi menor no grupo dos tratados em relação ao controle ($p < 0,001$). O ácido palmítico (16:0) foi menor no HLF/CN quando comparado ao HLF/AZ e HLF/S ($p < 0,001$). O ácido esteárico (18:0) e a soma dos ácidos graxos saturados não apresentou diferença entre os grupos estudados.

Em relação aos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), os quais estão apresentados na Tabela 13, o ácido palmitoléico (16:1) foi menor nos grupos experimentais em relação ao controle ($p < 0,001$). O ácido oleico (18:1), ômega 9 foi maior no HLF/AZ em relação ao HLF/S ($p < 0,05$), sendo o mesmo observado para a soma dos ácidos graxos monoinsaturados ($\sum$ MUFAs).

Entre os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) o ácido linoleico (18:2 n-6) o HLF/S apresentou maior em relação ao CT; HLF; HLF/AZ; HLF/CN ($p < 0,001$). O HLF/AZ foi significativamente menor em relação ao controle ($p < 0,001$). O ácido linolênico (18:3n-3) os grupos HLF e HLF/AZ foram menores comparado ao controle ($p < 0,001$) enquanto que os grupos HLF/CN e HLF/S foram maiores ($p < 0,001$). O HLF e HLF/AZ foram significativamente menores comparados ao HLF/CN e HLF/S ($p < 0,001$). O HLF/CN foi maior quando comparado ao HLF/S ($p < 0,001$). O ácido araquidônico (20:4 n-6) os grupos experimentais HLF ($p < 0,01$); HLF/AZ; HLF/CN e HLF/S ($p < 0,001$) foram menos em relação ao controle. Em relação ao ácido eicosapentaenoico, EPA (20:5n-3) o grupo HLF/CN foi significativamente maior em relação ao CT; HLF; HLF/AZ; HLF/S ($p < 0,001$). O HLF/AZ foi menor comparado com o CT e HLF/S ($p < 0,05$; $p < 0,01$, respectivamente). O ácido docosaexaenoico (20:6n-3) não houve diferença entre os grupos, embora o grupo HLF/CN apresente maior. A somatória de PUFA ($\sum$ PUFA) foi maior no HLF/S comparado ao HLF ($p < 0,05$) e HLF/AZ ($p < 0,01$).

A somatória de ácidos graxos ômega-6 (n-6) foi maior no HLF/S comparados ao HLF; HLF/AZ; HLF/CN ($p < 0,001$) e CT ($p < 0,05$). O HLF/AZ foi menor em relação ao controle ($p < 0,001$).

A somatória de ácidos graxos ômega-3 (n-3) não houve diferença significativa entre os grupos apesar do HLF/CN apresentar maior em relação aos demais grupos. A razão n-6/n-3 não diferiu estatisticamente entre os grupos.

Em relação ao índice de lipogênese (razão 16:0/18:2 n-6) o HLF/S apresentou um menor índice quando comparado aos outros grupos CT ($p<0,001$); HLF ($p<0,001$); HLF/AZ ($p<0,001$) e HLF/CN ($p<0,01$). O HLF/AZ apresentou maior índice em relação ao HLF/CN ($p<0,01$) e ao CT ($p<0,05$).

A razão C16:1/C16:0 e C18:1/C18:0 contribuem para verificar a atividade enzimática da delta-9-desaturase. A C16:1/C16:0 apresentou uma maior atividade no CT em relação aos outros grupos experimentais ($p<0,001$). Em relação a razão 18:0/16:0 para verificar a atividade da elongase não houve diferença significativa entre os grupos. Os dados estão descritos na tabela 14.

Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos hepáticos nos diferentes grupos estudados

Ácidos graxos saturados	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Ácido mirístico (C14:0)	0,44±0,05 ^a	0,32±0,07 ^{a,b}	0,23±0,06 ^b	0,22±0,07 ^b	0,21±0,05 ^b
Ácido palmítico (C16:0)	23,00±0,58 ^a	22,43±0,38 ^b	23,69±0,33 ^a	22,43±0,38 ^c	23,69±0,33 ^a
Ácido esteárico (C18:0)	6,56±1,78	5,76±3,40	6,89±2,76	8,67±4,23	7,04±2,82
Σ SFA	36,36±2,04	33,56±3,66	31,51±2,88	33,03±4,35	32,99±2,45
Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS)					
Ácido palmitoléico (16:1)	3,21±0,63 ^a	1,15±0,33 ^b	0,89±0,28 ^b	0,66±0,30 ^b	0,65±0,15 ^b
Ácido Oléico (18:1)	25,43±7,97 ^{a,b}	36,17±8,73 ^{a,b}	40,57±7,27 ^a	33,67±11,03 ^{a,b}	23,53±4,87 ^b
Σ MUFAs	29,49±8,61	38,28±9,23	42,69±8,14	35,27±11,78	24,94±5,21
Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS)					
Ácido linoleico (18:2 n-6)	21,90±3,92 ^a	18,19±1,55 ^{a,b}	14,31±1,43 ^b	18,48±2,64 ^{a,b}	29,64±1,44 ^c
Ácido α - linolênico (18:3 n-3)	0,67±0,13 ^a	0,34±0,05 ^b	0,23±0,04 ^b	1,23±0,10 ^c	1,00±0,19 ^d
Ácido araquidônico (20:4 n-6)	0,18±0,12 ^a	0,05±0,03 ^b	0,03±0,02 ^b	0,03±0,01 ^b	0,04±0,02 ^b
EPA (20:5 n-3)	0,16±0,05 ^a	0,10±0,01 ^{a,b}	0,07±0,01 ^b	0,33±0,06 ^c	0,18±0,02 ^b
DHA (22:6 n-3)	3,35±1,08	2,63±1,34	3,21±1,15	4,04±1,52	3,24±1,13
Σ PUFAs	34,18±7,29 ^{a,b}	28,17±5,93 ^a	25,80±5,33 ^a	31,70±7,42 ^{a,b}	42,08±2,78 ^b

Resultados expressos em média ± DP. ^{a,b,c} Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica (25% de banha + 25% de azeite) + frutose; HLF/CN – (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S – (25% de banha + 25% de soja) + frutose; Σ SFA: somatório de ácido graxo saturado; Σ MUFAs: somatório de ácido graxo monoinsaturado; Σ PUFAs: somatório ácido graxo poliinsaturado;

Tabela 14 - Somatório, razão n6/n3 e cálculo das razões de conversão dos ácidos graxos.

Σ e razões	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Σ n-6	22,38 $\pm$ 4,05 ^a	18,59 $\pm$ 1,61 ^{a,b}	14,67 $\pm$ 1,50 ^b	18,67 $\pm$ 2,65 ^{a,b}	30,10 $\pm$ 1,47 ^c
Σ n-3	11,58 $\pm$ 3,48	9,24 $\pm$ 5,20	10,90 $\pm$ 3,96	12,70 $\pm$ 4,91	11,59 $\pm$ 4,09
Razão n-6/n-3	2,02 $\pm$ 0,41	2,58 $\pm$ 1,28	1,49 $\pm$ 0,49	1,63 $\pm$ 0,50	2,92 $\pm$ 1,17
Razão 16:0/18:2 n-6	1,28 $\pm$ 0,26 ^a	1,43 $\pm$ 0,16 ^a	1,62 $\pm$ 0,16 ^b	1,23 $\pm$ 0,16 ^a	0,80 $\pm$ 0,02 ^c
Razão 16:1/16:0	0,11 $\pm$ 0,02 ^a	0,04 $\pm$ 0,01 ^b	0,03 $\pm$ 0,01 ^b	0,02 $\pm$ 0,01 ^b	0,02 $\pm$ 0,06 ^b
Razão 18:0/18:1	4,49 $\pm$ 2,92	9,23 $\pm$ 6,60	7,46 $\pm$ 5,24	5,86 $\pm$ 5,10	4,10 $\pm$ 2,45
Razão 18:0/16:0	0,24 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,13	0,29 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,18	0,29 $\pm$ 0,12

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^{a,b,c}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica (25% de banha + 25% de azeite) + frutose; HLF/CN – (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S – (25% de banha + 25% de soja) + frutose; Σ n-6: somatório ômega-6; Σ n-3: somatório ômega-3.

5.12 Quadros comparativos

Para uma visualização mais didática dos achados do presente estudo, apresentamos três quadros comparativos, sendo que as designações de aumento, diminuição ou manutenção foram feitas usando símbolos, respectivamente:

Aumento

Diminuição

Manutenção

No quadro 1 apresentamos o comparativo dos parâmetros séricos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha e frutose. No quadro 2 temos o comparativo dos parâmetros hepáticos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha. Finalmente no quadro 3 temos o comparativo das alterações no perfil de ácidos graxos hepáticos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha e frutose.

Quadro 1 - Parâmetros séricos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha e frutose

Parâmetros	Azeite	Óleo de canola	Óleo de soja
TGs	↑	=	=
VLDL	↑	=	=
Colesterol	=	=	=
HDL	=	=	↓
Glicemia	=	=	=
Razão TG/HDL	=	=	=

Resumo dos resultados apresentados. Resultados apresentados dos grupos experimentais em relação ao grupo hiperlipídica + frutose; TG: Triacilgliceróis; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade;

Quadro 2 - Parâmetros hepáticos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha e frutose.

Parâmetros	Azeite	Óleo de canola	Óleo de soja
MDA	=	↑	=
GSH	↓	↑	↑
VITAMINA E	=	=	=
Gordura total	=	↓	=
TGs	=	=	=
Colesterol	=	=	=
Score de Esteatose	↓	↓	↓

Resumo dos resultados apresentados. Resultados apresentados dos grupos experimentais em relação ao grupo hiperlipídica + frutose; MDA: malonaldeído; GSH: Glutathione reduzida; Vitamina E; TGs: Triglicerídeos hepáticos; Score de esteatose: Grau de esteatose (0-3);

Quadro 3 - Comparativo das alterações no perfil de ácidos graxos hepáticos em todos os grupos em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica com banha e frutose.

Ácidos graxos	Azeite	Óleo de canola	Óleo de soja
C14:0	=	=	=
C16:0	↑	↓	↑
C18:0	=	=	=
Somatório AGS	=	=	=
C18:1	=	=	=
C16:1	=	=	=
Somatório MUFAs	=	=	=
C18:2 n-6	=	=	↑
C18:3 n-3	=	↑	↑
C20:4 n-6	=	=	=
C20:5 EPA	=	↑	=
C22:6 DHA	=	=	=
Somatório PUFAs	=	=	↑

Discussão

6 DISCUSSÃO

A composição de ácidos graxos dos óleos e da banha utilizados no preparo das dietas demonstrou, como esperado, que a banha de porco é rica em ácido oleico, principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados. Tem alto teor de ácidos graxos saturados, principalmente o esteárico o mirístico e o palmítico e por fim rica em ácidos graxos poli-insaturados, com maior quantidade de ômega-6. O azeite extra virgem, conforme o esperado apresenta maior quantidade do somatório final de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs – 70%) na qual o mais abundante é ácido oleico (n-9), também apresentando uma alta quantidade de ácidos graxos saturados, sendo o predominante o ácido palmítico (16:0).

O óleo de soja possui maior quantidade de PUFAs, que encontrado de forma mais abundante, o ômega-6, seguido dos MUFAs, em abundância o ácido oleico (23,15%). O óleo de canola possui maior quantidade de MUFAs, na qual o mais abundante é o ácido oleico (n-9, 60%) seguido de ômega-3 rico principalmente em EPA e DHA. A composição do óleo de soja é semelhante ao trabalho publicado, tal como Siddiqui et al. (2016) enquanto que a composição do óleo de canola é semelhante ao trabalho de Lin et al (2013). Dados semelhantes ao azeite extra virgem são encontrados no estudo Assy; Nassar; Grosovski, (2009). Dados comparativos entre a composição centesimal do óleo de soja e óleo de canola são representados por Costa (et al). 2015.

Os óleos de canola e o azeite apresentaram uma menor razão de n6/n3 de 2,50 do primeiro para 2,17 do segundo, sendo que ambos possuem maior quantidade de MUFAs. Já a banha apresentou razão de 6,55 para 9,21 do grupo que recebeu óleo de soja. O índice de peroxidabilidade dos óleos foi maior no óleo de soja seguido de canola, azeite e banha de porco, apresentado de acordo com o número de ligações insaturadas. Os dados encontrados no estudo demonstram que a razão n6/n3 não influenciou nos mecanismos de esteatose hepática. Siddiqui et al., (2015) apresentou dados parecidos em um estudo comparativo com diferentes formulações lipídicas e que demonstra que a relação n3/n6 não apresenta relação com a esteatose hepática, porém demonstra que essas formulações tem quantidade similares de relação de ácidos graxos insaturados/saturados. O mesmo pode ser observado em um estudo por KAJIKAWA et al. (2009) onde demonstra que a relação n6/n3 não influencia na esteatose hepática.

As dietas ofertadas ao grupo controle foram isolocalóricas enquanto que os grupos experimentais foram dietas hipercalóricas. O crescimento diferente dos animais era esperado. O grupo HLF apresentou um aumento de peso de forma crescente ao longo das 16 semanais experimentais em relação ao controle. Dados correlacionam positivamente em um estudo que demonstra animais que foram submetidos a uma dieta ocidental, rica em gordura saturada e bebida açucarada (glicose + frutose) também por 16 semanais experimentais demonstraram um maior ganho de peso do grupo HLF em relação ao grupo controle (MACHADO et al., 2015). Em outro estudo realizado com ratos wistars por 16 semanas com diferentes composições de dieta, incluindo alta e moderada quantidade de gordura, alta quantidade de sacarose e frutose, o grupo com hiperlipídica aumentou o peso corporal em relação ao controle, assim como peso do tecido hepático (LAU; ZHANG; YU, 2017). Os animais tratados com os respectivos óleos mantiveram um ganho de peso gradual e homogêneo similar ao controle, tais dados também podem ser evidenciados por Siddiqui et al., 2015 em um estudo comparativo com diferentes formulações lipídicas ricas em n-9, n-7 e n-3 e em camundongos induzidos por esteatose por sacarose ou frutose.

O consumo de dieta teve algumas variações durante o estudo, com apenas o grupo HLF refletindo no peso dos animais, através da taxa de eficiência da dieta. A introdução da dieta hiperlipídica foi associada à redução da ingestão alimentar, exceto no grupo HLF/AZ que resultou em um aumento da ingestão alimentar e energético durante todo o período experimental, porém não refletiu no ganho de peso. Os MUFAs da dieta previnem o acúmulo de gordura central e diminuem a expressão pós prandial de adiponectina induzida por uma dieta rica em carboidratos em pacientes insulino – resistentes (PRIORE et al, 2015). A ingestão energética (kcal/dia) foi significativamente menor no controle em relação ao HLF/AZ. Dados similares são encontrados em um estudo com camundongos C57/BL induzido síndrome metabólica por dieta hiperlipídica (45%) e rica em frutose (30%) em um período de 8 meses, os dados demonstram uma maior ingestão energética do grupo HLF em relação ao CT. (DISSARD et al., 2013). O maior consumo nesse grupo pode estar associado a melhor palatabilidade da dieta. Tendo em vista que o período experimental foi de 4 meses, o consumo alimentar e o crescimento dos animais refletem a boa adaptação dos animais às dietas ofertadas.

O peso do tecido hepático foi maior no grupo HLF comparado ao controle. Em um estudo similar no desenvolvimento de NAFLD e NASH camundongos C57/BL jovens receberam uma dieta hiperlipídica associada ao consumo de glicose e frutose apresentaram um aumento do peso hepático em relação ao controle, tanto em fêmeas quanto em machos (MARIN et al., 2016). A oferta de frutose como única fonte de carboidratos é capaz de induzir a esteatose hepática em ratos (ACKERMAN et al, 2015). Também a oferta de sacarose, a qual é composta por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, a ratos provocou dislipidemia, aumento de peso, adiposidade visceral e redução da sensibilidade à insulina (FORTINO; LOMBARDO; CHICCO, 2007). Os grupos que receberam os respectivos óleos diminuíram o peso hepático em relação HLF, porém apenas o óleo de soja diminuiu significativamente quando comparado ao HLF. Vários estudos demonstraram que ácido graxo ômega - 3 e ômega-6 suprimem a lipogênese e o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica (KONUMA et al.,2015; KAJIKAWA et al.,2009; WILSON et al.,1990).

O tecido adiposo epididimal não demonstrou alteração entre os grupos. A suplementação do ômega-3 é associada à redução da hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo (QUEIROZ et al., 2009)

O tecido adiposo retroperitoneal foi maior no HLF comparado ao CT e menor no HLF/CN comparado ao HLF. O efeito dos PUFAs reflete na ingestão de ácidos graxos essenciais e na lipólise do tecido adiposo (SIDDIQUI et al, 2015). Em um estudo com suplementação de PUFAs em ratos foi associado com uma redução da lipogênese do tecido adiposo (CLARKE; ROMSOS; LEVEILLE, 1977). Em relação à soma total dos tecidos adiposos (Epididimal + retroperitoneal) houve um aumento significativo do HLF em relação ao CT, contudo a intervenção com os respectivos óleos não foi capaz de diminuir os tecidos juntos.

As dietas hipercalóricas interagem com os fatores genéticos e resultam em acúmulo hepático de lipídeos e levam a injúria celular. Em contraste estudos com ácidos graxos poli-insaturados reportaram inibir a esteatose hepática não alcoólica (BASARANOGLU et al.,2013). No presente estudo, houve um maior acúmulo de gordura hepática e de triacilgliceróis no grupo HLF em comparação com o CT.

Dissardi et al, 2013 em seu estudo com camundongos C57/BL administrou uma dieta com 45% de gordura e 30% de frutose livre na água, durante 8 meses de experimento, verificou uma degeneração hepática indicando acúmulo de gordura hepática, através de análise histopatológica. No presente estudo pode ser

observado através da análise histopatológica um maior acúmulo de gordura hepática classificando uma esteatose macro e microvesicular de moderada a severa em animais que receberam a dieta com gordura saturada e frutose quando comparado ao CT. Os animais que receberam os respectivos óleos diminuíram a esteatose hepática. Em alguns estudos com roedores com dietas enriquecidas com azeite extra virgem demonstram um maior acúmulo de gordura hepática. O grupo HLF/AZ foi classificado como esteatose leve a moderado enquanto os grupos HLF/CN e HLF/S apresentaram uma esteatose leve. Os ácidos graxos polinsaturados (n-6 e n-3) parecem estar associados com supressão da lipogênese por inibir genes envolvidos na transcrição como SREBP1C (KAJIKAWA et al., 2009).

Segundo Hijona et al (2010), a quantificação bioquímica de gordura hepática apresenta boa correlação com a classificação histológica da esteatose hepática proposta por Kleiner e Brunt (2005).

Em relação aos parâmetros bioquímicos apresentados no presente estudo, o grupo HLF/AZ apresentou uma maior quantidade de TGs séricos e VLDL séricos quando comparados ao HLF/S. PERONA; RUIZ-GUTI_ERREZ., (2000) em seu estudo com ratos hipertensivos alimentados com dieta rica em azeite por 12 semanas, verificou um aumento de TAGs com aumento de ácidos graxos livres. Outros estudos demonstram que roedores alimentados com dietas enriquecidas com azeite extra virgem aumentam a atividade da acil coa carboxilase e da ácido graxo sintase e diminui atividade da carnitil palmito transferase aumentando assim a lipogênese e diminuindo a β oxidação (PRIORE et al, 2015). Os relatos do azeite sobre esteatose hepática têm sido variáveis reportando aumento, diminuição ou ausência. A variabilidade parece depender do modelo utilizado, quantidade e tipo de azeite utilizado (SIDDIQUI et al., 2015; PRIORE et al., 2015).

Já os valores reduzidos com o óleo de soja podem estar relacionados com a ação dos ácidos graxos poli-insaturados (n-6), em maior quantidade nesse óleo vegetal com a supressão da lipogênese, além desses ácidos graxos regular a expressão do PPAR α , aumentando a degradação de ácidos graxos (SIDDIQUI et al., 2015).

Em relação ao HDL colesterol, no presente estudo o HLF e HLF/AZ apresentaram uma maior quantidade. Covas et al. (2006) Em um estudo com 200 voluntários do sexo masculino, foi capaz de demonstrar que os efeitos da ingestão de azeite extra virgem aumentaram as quantidades de HDL plasmáticas.

Como o observado no estudo, o HLF/CN apresentou menor quantidade de TGs quando comparado ao HLF/AZ e não obteve alteração quanto ao colesterol sérico em relação aos outros grupos, além de apresentar menor quantidade de acúmulo de gordura hepática e apresentar uma esteatose leve de acordo com análise histológica. Alguns estudos comparado o efeito do óleo de canola em comparação com uma dieta do estilo ocidental (rica em gorduras saturadas) demonstraram que o grupo que recebeu óleo de canola foi capaz de reduzir os TGs séricos (LIN et al 2013). Em outro estudo comparando o óleo de canola com outros óleos ricos em MUFAs e PUFAs, incluindo uma mistura de óleo de canola com óleos de linhaça, milho, azeite extra virgem ou girassol, demonstraram melhora no perfil lipídico (TG, HDL e LDL) em comparação a outros óleos (SIDDIQUI et al., 2015).

A glicemia de jejum não apresentou diferenças entre os grupos. Yang et al. (2015) em seu estudo com diferentes proporções de n6/n3 também não encontrou diferença significativa entre os grupos. Segundo o estudo de Fan et al. (2011), a razão triglicerídeos/HDL colesterol pode ser utilizada como um preditor da resistência à insulina, em que baixos níveis de HDL colesterol e triglicerídeos elevados são fatores de risco para a RI. No caso do estudo em questão não houve diferença entre os grupos estudados.

Em um estudo comparando dietas com razão PUFAs/SFAs alta e baixa em relação à peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes hepáticas, verificou-se que as ratas alimentadas com dietas com valor maior em PUFAs apresentaram maiores valores de SRATB (KANG; AHN; LEE, 2005). Estudos recentes tem demonstrado que os PUFAs estão sujeitos a uma maior peroxidação lipídica que os SFAs (HAGGAG; ELSANHOTY; RAMADAN, 2014) Jarukamjorn et al. (2016) em seu estudo em camundongos alimentados com dieta com hiperlipídica (45% -banha) e com frutose na água (20%) observou um aumento de MDA e uma diminuição de GSH e outros marcadores de peroxidação e antioxidantes após 8 semanas de administração da dieta. No presente estudo pode se observar um aumento do MDA nos grupos que receberam as dietas experimentais, em especial no óleo de canola porém ocorre apenas um aumento do GSH hepático no óleo de canola e óleo de soja. A suplementação com n-3 reduz o conteúdo de lipídeos, com aumento da resposta inflamatória e antioxidante além de melhorar a sensibilidade à insulina (BELLANTI et al., 2017) Os ácidos graxos poli-insaturados inibem a lipogênese *de novo*, modulando assim a inflamação, estresse oxidativo, reações imunes, estresse

do retículo endoplasmático, apoptose e necrose. Contudo os ácidos graxos que se acumulam nos hepatócitos durante o desenvolvimento da esteatose modulam o desenvolvimento e a progressão de NAFLD para NASH/cirrose (SIDDIQUI et al, 2015).

A vitamina E foi maior no grupo CT em relação ao HLF conforme já esperado. Em relação aos grupos experimentais não houve diferença em relação à vitamina E, o que significa que o GSH foi usado como antioxidante enquanto a vitamina E se manteve preservada. A preservação da vitamina E sérica provavelmente contribuiu para a preservação da GSH. A GSH é utilizada na regeneração da vitamina E por meio da redução do radical tocoferol (VALKO et al., 2007) e desta forma pode influenciar a sua concentração.

Em relação à incorporação dos ácidos graxos saturados, o HLF/AZ e HLF/S tiveram uma maior incorporação do ácido palmítico (C16:0) em relação ao HLF/CN. Os MUFAs, em especial o ácido oleico foi incorporado pelo grupo HLF/AZ, sendo maior que o HLF/S. Os PUFA's, em especial o ácido linoleico (n-6) foi maior no HLF/S e no grupo CT (composto com 7 % de óleo de soja). O ALA (ômega-3) teve melhor incorporação pelo HLF/CN e HLF/S enquanto teve menores quantidades no HLF/AZ. O mesmo pode ser observado pela conversão do ALA (N-3) em EPA (20:5 n-3) em que teve uma maior quantidade no HLF/CN em relação ao controle e ao grupo HLF. Foi menor incorporado no grupo HLF/AZ. O DHA (22:6 n-3) estatisticamente não teve alteração, porém foi melhor incorporado pelo HLF/CN e HLF/S.

A relação C16:0 para C18:2 n-6 é usada para calcular o índice de lipogênese de novo (HUDGINS et al, 1996) O índice de lipogênese *de novo* introduzida por Hudgins et al. (1996), no presente estudo o HLF/AZ apresentou maior índice enquanto o soja seguido do canola apresentaram menor índice.

De acordo com os dados do presente estudo, Puri et al avaliou o perfil do plasma e através de biópsia hepática de pacientes com NAFLD. Os pacientes demonstraram um aumento da lipogênese *de novo* e aumento dos ácidos graxos: palmítico (16:0); palmitoleico (16:1 n-7), esteárico (18:0) e ácido oleico (18:1 n-9). Lozano et al. (2015) em seu estudo comparando a dieta com sacarose mostrou aumento dos ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) e MUFAs (18:1 n-7 e 18:1 n-9) no plasma dos animais quando comparado com o CT, todas as emulsões lipídicas testadas no estudo diminuíram as concentrações totais de ácidos graxos saturados

e MUFAs, sendo que o óleo de peixe aumentou as concentrações de ômega-3 e o óleo de soja aumentou as concentrações de ômega-6.

De acordo com os achados no presente estudo, o óleo de canola obteve maior quantidade de parâmetros benéficos em relação aos demais óleos. Obteve maior incorporação de ácidos graxos poli-insaturados, em especial ômega-3 com maior conversão em EPA e DHA. Em um estudo realizado por Suzuki-kemuriyama et al.(2016) com camundongo C57/BL alimentados por 14 semanas com dieta padrão suplementada com 5% de EPA e 5% de DHA ou ambos em uma dieta hiperlipídica reduziu os níveis hepáticos de ácido palmítico, palmitoléico e ácido oleico, aumentando o nível de EPA. No mesmo estudo foi verificado que o EPA atua diferentemente na supressão de TG hepático com redução do acúmulo de TG hepático enquanto que DHA atua em um estágio mais avançado da patologia na inflamação e estresse oxidativo. Dados correlacionam-se positivamente com o estudo em questão.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com o presente estudo, o modelo misto de dieta hiperlipídica e rica em frutose administrada por um período de 16 semanas foi eficiente na indução de esteatose hepática não alcoólica e algumas características da síndrome metabólica, porém não chegou a um modelo de NASH.

A modulação da dieta hiperlipídica e rica em frutose como forma de prevenção ou reversão de esteatose hepática não alcoólica se mostrou eficiente. Como parâmetros gerais houve manutenção do peso corporal dos animais que receberam os respectivos óleos ao longo do experimento e diminui o score de esteatose hepática de acordo com a avaliação histopatológica.

Citando características especiais de cada óleo, o azeite extra virgem, rico em ácidos graxos monoinsaturados em especial o ômega-9 e ácido graxo saturado (C16:0 – palmítico), apresentou algumas características positivas e outras negativas em relação aos parâmetros avaliados. Em relação a parâmetros bioquímicos houve um aumento dos níveis séricos de TGs e VLDL. Teve um aumento o estresse oxidativo e diminuiu a proteção antioxidante. Teve maior incorporação de ácidos graxos saturados (16:0) e de ácido oleico (n-9) enquanto teve menor incorporação de ALA. Quanto aos parâmetros positivos apresentados houve uma redução do colesterol sérico e aumento HDL.

O óleo de canola devido a seu teor em ácidos graxos PUFA (n-6 e n-3) teve maior incorporação do EPA que parecem ter evidenciado positivamente. Apresentou um menor peso de tecido adiposo retroperitoneal em relação aos demais grupos. Não teve alteração nos parâmetros bioquímicos e apresentou menor acúmulo de gordura hepática através da análise do percentual de gordura hepática e histopatologia. Pela peroxidação lipídica apresentou um maior acúmulo de MDA, porém um aumento de GSH.

O óleo de soja também apresentou efeitos benéficos também relacionados à menor peso hepático, diminuiu a esteatose quando comparado ao HLF através da histologia. Em relação aos parâmetros bioquímicos apresentou maior quantidade de colesterol sérico e redução dos níveis de HDL. Em relação ao estresse oxidativo, teve maior acúmulo de MDA hepático, porém também teve um aumento de parâmetros antioxidantes (GSH).

De acordo com os dados apresentados no estudo, a relação de n3/n6 parece não ter influência com a prevenção da esteatose hepática. Apesar do azeite (rico em MUFAs) ter apresentado algumas características benéficas do ponto de vista bioquímica, os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 parecem ter mais influência na prevenção/reversão da esteatose hepática não alcoólica em um modelo de dieta hiperlipídica e rica em frutose.

Dessa forma, o uso futuro de formulações lipídicas (óleos vegetais comerciais) dando atenção para o óleo de canola e de soja parece ser uma alternativa interessante para prevenção/tratamento de esteatose em uma dieta rica estilo ocidental, visando ser uma alternativa de baixo custo e fácil aplicabilidade em pacientes com NAFLD. Porém devido à baixa quantidade de estudos com formulações lipídicas, fica evidente a necessidade de estudos futuros explorado melhor esses óleos em quantidades na expressão de genes de enzimas de síntese de degradação, fatores de transcrição, sistema antioxidante e aplicabilidade prática em pacientes com NAFLD. Os dados do estudo são inéditos mostrando a eficácia, mesmo que parcial, dos respectivos óleos na reversão do quadro esteatótico.

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENAVOLI, L. et al. Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. **World J Gastroenterol**. V.20. p. 16831-16840, 2014.

ACKERMAN Z, ORON-HERMAN M, GROZOVSKI M, ROSENTHAL T, PAPPO O, LINK G, et al. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. **Hypertension**. May;45(5):1012-8, 2005. PubMed PMID: 15824194. Epub 2005/04/13. Eng

ANDREOLI, M. F.; et al. Conjugated Linoleic Acid Reduces Hepatic Steatosis and Restores Liver Triacylglycerol Secretion and the Fatty Acid Profile During Protein Repletion in Rats. **Lipids**. v. 45, n. 11, p. 1035-45, 2007.

ARNAUD, J.; et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatography**. v. 572, n. 1-2, p. 103-116, 1991.

ASRIH, M; ORNAYVAZ, F.R. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. **Clinical Nutrition**. V.33. p. 186 -190, 2014.

ASSY N, NASSAR F, NASSER G, GROSOVSKI M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol** 15(15): 1809-1815, 2009; DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.1809>.

BASARANOGLU M, BASARANOGLU G, SABUNCU T, SENTURK H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. **World J Gastroenterol**. 19:1166–72, 2013.

BASARANOGLU, M.; BASARANOGLU, G.; SENTÜRK, H. From fatty liver to fibrosis: A tale of “second hit”. **World Journal of Gastroenterology**. v. 19, n. 8, p. 1158-1165, 2013.

BELLANTI et al. Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis, **Free Radical Biology and Medicine**. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.023>

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian **Journal of Biochemistry and Physiology**. v. 37, n. 8, p. 911-7, 1959.

CASTRO, G..S, Calder PC, Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids, **Clinical Nutrition**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2017.01.006>

CASTRO, G.F.S et al. Dietary Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid Influence Liver Triacylglycerol and Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fructose Diet **Mar. Drugs**, v.13, p.1864-1881;2015 doi:10.3390/md13041864.

CASTRO, G.F.S et al., Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol. 26 (Supl. 2), 2011.

CLARKE SD, ROMSOS DR, LEVEILLE GA. Differential effects of dietary methylesters of long-chain saturated and polyunsaturated fatty acids on rat liver **J Nutr**. Jul;107(7):1170-81, 1977.

COSTA et al. Impact of a high-fat diet containing canola or soybean oil on body Development and bone; parameters in adult male rats ; **Nutr Hosp**.;31(5):2147 2153, 2015. DOI:10.3305/nh.2015.31.5.8231

COSTA, C.M.; DOS SANTOS, R.C.C.; LIMA, E.S. A simple automated procedure for thiol measurement in human and serum samples. **O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, p. 345-350, 2006.

COTRIM HP, PARISE ER, OLIVEIRA CP, LEITE N, MARTINELLI A, GALIZZI J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Ann Hepatol**, 2011;10:33e7.

CRESCENZO, C. et al. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. **Exp Physiol**.v 99.pag. 1203–1213, 2014.

DAY, C.P.; JAMES, O. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**. v. 114, p. 842–5, 1998.

DIETRICH, P; HELLERBRAND, C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. V.28. p. 637- 653, 2014.

DISSARD R, KLEIN J, CAUBET C, BREUIL B, SIWY J, et al. Long Term Metabolic Syndrome Induced by a High Fat High Fructose Diet Leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. **Plos one**. Oct 3;8(10):e76703, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076703. eCollection 2013.

FAN X.; et al. Triglyceride/highdensity lipoprotein cholesterol ratio: a surrogate to predict insulinresistance and lowdensity lipoprotein cholesterol particle size in nondiabetic patients with schizophrenia. **The Journal of Clinical Psychiatry**. v. 72, n. 6, p. 806-12, 2011.

FERRAMOSCA, A; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World J Gastroentero**. February 21; 20(7): 1746-1755, 2014.

FIERBINTEANU-BRATICEVICI, C.; et al. Predictive Factors for Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**. v. 20, n. 2, p. 153-159, 2011.

FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**. 226(1):497-509. PubMed PMID: 13428781, 1957.

FORTINO MA, LOMBARDO YB, CHICCO A. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. **NutritionJ**; 23(6):489-97, 2007. PubMed PMID: 17573998. Epub 2007/06/19. eng.

GERARD-MONNIER D. et al. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**. v. 11, n. 10, p. 1176-83, 1998.

GRATTAGLIANO, L. et al. Managing nonalcoholic fatty liver disease: recommendations for family physicians. **Canadian Family Physician**. v. 53, n. 5, p 857-63, 2007.

HIJONA, E.; et al. Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by the Soxtec method. **World Journal of Gastroenterology**. v. 16, n. 2, p. 1495-9, 2010.

HUDGINS LC, HELLERSTEIN M, SEIDMAN C, NEESE R, DIAKUN J, HIRSCH J. HUMAN **International Sugar Organization. Sugar Year Book**. London: ISO, 2008.

JAMES M. RIPPE; THEODORE J. ANGELOPOULOS. SUGARS, obesity, and cardiovascular disease: results from recente randomized control trials. **Eur J Nutr** 55 (Supl 2):S45–S53, 2016. DOI 10.1007/s00394-016-1257-2

JUMP, D.B. Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 14, p. 115–120, 2011.

KAJIKAWA S, HARADA T, KAWASHIMA A, IMADA K, MIZUGUCHI K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. ;80:229–38, 2009.

KANG MJ, AHN HS, LEE SS. Effects of polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and antioxidant supplementation on hepatic TBARS and enzyme activities under the maintenance of dietary peroxidizability index value in young and adult rats. **Ann Nutr Metab** Sep-Oct;49(5):304-11, 2005. PubMed PMID: 16088095. Epub 2005/08/10. eng.

KANI, A.H; ALAVIAN, S.M; HAGHIGHATDOOST, F. AZADBAKHT, L. Diet Macronutrients Composition in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review on the Related Documents. **Hepatmon**.10939.DOI: 10.5812. 2014.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **International Journal of Molecular Science**. V. 14, p. 11963–11980, 2013

KLEINER, D.E.; et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. v. 41, p. 1313-1321, 2005.

KONUMA K, ITOH M, SUGANAMI T, KANAI S, NAKAGAWA N, SAKAI T, et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using melanocortin 4 receptor-deficient mice. **PLoS One**.;10, e0121528. 2015.

KRIS-ETHERTON PM, TAYLOR DS, YU-POTH S, HUTH P, MORIARTY K, FISHELL V, et al. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **The American journal of clinical nutrition**.Jan;71(1 Suppl):179S-88S, 2000.

LAU JENNIE KA; ZHANG XIANG; CHING; YU JUN. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **J Pathol**; 241: 36–44, 2017.

LEWIS, T., P. D. NICHOLS, et al. "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs." **J Microbiol Methods** 43(2): 107-116, 2000.

LIN et al. Evidence of health benefits of canola oil. **Nutrition Reviews**. Vol. 71(6):370–385, 2, 2013. doi:10.1111/nure.12033.

LOGUERCIO, C.; et al. Non-alcoholic fatty liver disease in an area of southern Italy: main clinical, histological, and pathophysiological aspects. **Journal of hepatology**. v. 35, p. 568–574, 2001.

LOWRY, O. H., N. J. Rosebrough, et al. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J Biol Chem** 193(1): 265-275, 1951.

LOZANO et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutrition & Metabolism** 13:15, 2016. DOI 10.1186/s12986-016-0074-1

LUDWIG, J. et al., Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hithertounnamed disease. **Mayo Clin. Proc.** 55: 434–438, 1980.

MACHADO MV, MICHELOTTI GA, XIE G, DE ALMEIDA TP, BOURSIER J, BOHNIC B, et al. Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. **PLoS ONE** 10(5): e0127991, 2015.

MACHADO, M.V.; et al. Blood oxidative stress markers in nonalcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 43, p. 95–102, 2008.

MARIN V, ROSSO N, DAL BEN M, RASENI A, BOSCHELLE M, DEGRASSI C, et al. An Animal Model for the Juvenile Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. **PLoS ONE** 11(7), 2016. e0158817.

MOHAMMAD EL-SAYED YASSIN EL-SAYED HAGGAG, RAFAAT MOHAMED ELSANHOTY, MOHAMED FAWZY RAMADAN. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. **Asian Pac J Trop Biomed** 2014; 4(1): 52-58, 2014. doi:10.1016/S2221-1691(14)60208-2

MOORE, J.B. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 69, p. 211–220, 2010. doi:10.1017/S0029665110000030

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 21240-21257, 2013.

NEUSCHWANDER-TETRI BA, CALDWELL SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. **Hepatology**;37:1202e19,2003. <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2003.50193>

PAGLIALUNGA, SABINA; DEHN, CLAYTON A. Clinical assessment of hepatic de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. **Lipids in Health and Disease**. 15:159, 2016. DOI 10.1186/s12944-016-0321-5.

PAMPLONA, R., et al. "Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals." **J Lipid Res** 39 (10): 1989-1994, 1998.

PERONA, J. S. AND RUIZ-GUTI_ERREZ, V.). Effect of two high-oleic oils on the liver lipid composition of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**. 66, 521-531, 2000.

PRIORE et al. Modulation of Hepatic Lipid Metabolism by Olive Oil and its Phenols in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, Volume 67, Number 1, Pages 9–17, 2015. DOI 10.1002/iub.1340 PubMed PMID: 10617969.

QUEIROZ, J.C.F.; et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v. 53, n. 5, p. 582-94, 2009.

RAHIMI, R.S.; LANDAVERDE, C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolic Syndrome: Clinical Implications and Treatment. **Nutrition in Clinical Practice**. v. 28, n. 1, p. 40-51, 2013.

REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC, JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**. Nov;123(11):1939-51,1993. PubMed PMID: 8229312.

RIPPIE, J.M; ANGELOPOULOS, T.J. Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. **Eur J Nutr**. 55 (Suppl 2):S45–S53, 2016. DOI 10.1007/s00394-016-1257-2

RODAS, MARIA CATALINA HERNANDEZ; VALENZUELA, RODRIGO;

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analitical Biochemistry**. v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SIDDIQUI et al. Comparative study of the modulation of fructose/sucrose-induced hepatic steatosis by mixed lipid formulations varying in unsaturated fatty acid content. **Nutrition & Metabolism**.12:41, 2015. DOI 10.1186/s12986-015-0038-x

SIMOPOULOS AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*= **Biomedecine & pharmacotherapie**. Oct;56(8):365-79, 2002. PubMed PMID: 12442909.

SUZUKI-KEMURIYAMA N, MATSUZAKA T, KUBA M, OHNO H, HAN S-I, TAKEUCHI Y, et al. Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. **PLoS ONE** 11(6), 2016. e0157580. doi:10.1371/journal.pone.0157580

TAPPY L, LE KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological reviews**. Jan;90(1):23-46, 2010. PubMed PMID: 20086073.

TESSARI, P.; et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 19, n. 4, p. 291-302, 2009.

TORRES, D.M., WILLIAMS, C.D.; HARRISON, S.A. Features, Diagnosis, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**. v. 10, n. 8, p.837–858, 2012.

VALKO, M.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Biochemistry and Cell Biology**. v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007

VIDELA, LUIS A. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Int. J. Mol. Sci**, 16, 25168-25198, 2015. doi:10.3390/ijms161025168.

WILSON MD, BLAKE WL, SALATI LM, CLARKE SD. Potency of polyunsaturated and saturated fats as short-term inhibitors of hepatic lipogenesis in rats. **J Nutr**. 120:544–52, 1990.

YANG et al. Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. **Lipids**;51:49–59, 2016. DOI 10.1007/s11745-015-4091-z.

YOON, H; CHA, B.S. Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Hepatol**; 27; 6(11): 800-811, 2014. ISSN 1948-5182.

ZIVKOVIC, A.M, GERMAN, J.B, SANYAL, A.J. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. **Am J Clin Nutr**; 86:285–300, 2007. PMID: 17684197

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A - Evolução do peso semanal dos animais (g)

Semanas	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
Peso inicial	22,4±1,35 ^{a,b}	22,4±1,3 ^{a,b}	23,0±1,05 ^a	21,8±0,78 ^{a,b}	21,2±1,39 ^b
2	23,6±1,50	24,3±1,33	24,6±1,35	23,8±1,13	21,2±1,39 ^b
3	24,5±1,71	26,0±1,82	25,5±1,65	25,4±1,50	25,3±1,76
4	25,8±1,75	27,6±2,45	26,8±1,31	26,6±1,83	26,5±1,77
5	26,3±1,82 ^a	29,4±2,45 ^b	28,0±2,16 ^{a,b}	27,8±1,75 ^{a,b}	27,6±2,13 ^{a,b}
6	27,3±2,05 ^a	30,9±3,07 ^b	28,8±1,47 ^{a,b}	28,5±2,01 ^{a,b}	28,5±2,44 ^{a,b}
7	28,5±2,41 ^a	32,0±3,18 ^b	29,7±2,31 ^{a,b}	29,4±1,83 ^{a,b}	29,5±2,82 ^{a,b}
8	29,3±2,21 ^a	33,4±3,62 ^b	30,9±1,52 ^{a,b}	30,5±2,36 ^{a,b}	30,6±2,66 ^{a,b}
9	29,8±2,48 ^a	35,0±4,32 ^b	30,6±1,89 ^{a,b}	31,2±2,34 ^a	30,6±2,66 ^a
10	30,2±2,78 ^a	36,7±4,64 ^b	30,8±3,01 ^{a,b}	31,5±2,87 ^a	30,7±3,05 ^a
11	30,3±2,79 ^a	37,1±4,79 ^b	30,8±3,72 ^{a,b}	31,4±3,06 ^a	30,8±4,29 ^a
12	31,6±3,20 ^a	38,7±5,20 ^b	32,3±3,05 ^{a,b}	32,7±3,30 ^a	33,1±4,61 ^a
13	33,7±3,30 ^a	41,4±6,02 ^b	34,2±2,65 ^{a,b}	33,8±2,65 ^a	35,1±4,85 ^a
14	35,0±3,00 ^a	43,1±5,60 ^b	34,6±3,59 ^{a,b}	35,1±3,72 ^a	35,5±5,15 ^a
15	35,0±3,24 ^a	43,7±6,11 ^b	35,5±3,71 ^{a,b}	35,8±3,79 ^a	35,8±5,59 ^a
16	34,8±3,45 ^a	44,2±5,69 ^b	35,4±4,19 ^{a,b}	36,1±3,92 ^a	36,2±5,70 ^a

Resultados expressos em média ± DP. ^{a,b}. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,05) CT – grupo controle; HLF – grupo hiperlipídica + frutose (50% banha); HLF/AZ – grupo hiperlipídica + frutose (25% de banha + 25% de azeite) + frutose; HLF/CN – (25% de banha + 25% de canola) + frutose; HLF/S – (25% de banha + 25% de soja) + frutose;

Apêndice B - Evolução de ingestão alimentar semanal dos animais (g)

Semanas	CT	HLF	HLF/AZ	HLF/CN	HLF/S
1	27,52±1,72 ^{a,b}	28,34±3,16 ^{a,b}	29,29±3,24 ^{a,b}	23,38±4,32 ^b	27,56±6,13 ^{a,b}
2	20,44±2,16	22,48±3,50	26,08±4,40	20,90±4,94	20,34±4,51
3	22,58±1,99 ^{a,b}	18,28±4,50 ^a	26,26±6,93 ^b	21,48±1,77 ^{a,b}	21,75±3,60 ^{a,b}
4	27,06±0,61 ^a	22,04±4,86 ^{a,b}	26,92±5,71 ^a	23,50±3,13 ^{a,b}	20,05±2,60 ^b
5	19,54±2,27 ^a	18,20±1,73 ^{a,b}	22,92±2,17 ^c	20,34±1,13 ^{a,b,c}	20,48±2,48 ^{a,b,c}
6	28,23±3,20 ^a	16,98±1,88 ^b	23,66±2,25 ^c	20,16±1,64 ^b	21,83±3,40 ^c
7	26,46±2,11 ^a	15,38±1,02 ^b	3,02±0,32 ^c	2,88±0,32 ^c	2,77±0,47 ^c
8	25,16±1,20 ^a	15,95±1,78 ^b	20,98±2,32 ^c	18,94±1,38 ^{c,d}	18,28±1,23 ^d
9	25,46±3,36 ^a	18,02±1,01 ^b	18,54±1,91 ^b	19,45±1,90 ^b	20,15±2,49 ^b
10	26,64±1,91 ^a	17,70±1,04 ^b	20,86±1,72 ^c	20,84±2,01 ^c	20,35±0,91 ^c
11	26,30±1,78 ^a	18,10±1,46 ^b	21,64±1,73 ^c	20,80±1,78 ^c	19,88±0,87 ^c
12	23,20±1,58 ^a	16,10±1,68 ^b	21,28±1,65 ^{a,c}	18,76±2,05 ^d	18,03±2,38 ^d
13	26,28±2,03 ^a	16,00±0,45 ^b	17,32±1,26 ^b	15,74±1,44 ^b	16,53±0,98 ^b
14	21,38±2,13 ^a	15,42±1,81 ^b	20,50±2,64 ^b	18,26±2,40 ^c	16,45±1,90 ^c
15	23,32±3,42 ^a	15,48±1,33 ^c	17,92±1,60 ^{b,c}	17,14±1,42 ^{b,c}	19,03±1,68 ^c
16	21,00±0,01 ^a	18,20±2,50 ^b	21,00±2,02 ^{a,c}	19,60±2,15 ^{a,b,c}	20,56± 3,06 ^{a,b,c}

Anexo

ANEXO

Anexo I - Comitê de ética animal

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO</p> <p>— Comissão de Ética no Uso de Animais — (16)3315-3301</p>
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 017/2015, sobre o projeto intitulado <i>“Efeitos dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica rica em frutose”</i>, sob a responsabilidade do Professor Doutor Alceu Afonso Jordao Junior está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 30 de março de 2015.</p>		
<p>We certify that the protocol nº 017/2015, entitled <i>“Effects of fatty acids of vegetable oils on lipid metabolism and oxidative stress in rats fed high-fat diet rich in fructose”</i>, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/30/2015.</p>		
<p>Ribeirão Preto, 30 de março de 2015.</p>		
<p> Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto Presidente da CEUA – FMRP - USP</p>		