UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLINICA MEDICA

BIANCA BELLIZZI DE ALMEIDA

**Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática
e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos**

RIBEIRÃO PRETO

2011

BIANCA BELLIZZI DE ALMEIDA

**AÇÕES DO ÓLEO DE PEIXE E TRIGLICERÍDEOS DE CADEIA MÉDIA NA
ESTEATOSE HEPÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS PELA DIETA
HIPERLIPÍDICA EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica. **Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior**

Ribeirão Preto
2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Bianca Bellizzi de

Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos

121 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Jordão Jr., Alceu Afonso

1. esteatose hepática não alcoólica, 2. dieta hiperlipídica, 3. ácidos graxos poli-insaturados ômega-3; 4. triglicerídeos de cadeia média; 5. ratos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca Bellizzi de Almeida

Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos.

Dissertação de mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para a obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

Aprovação em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A meus pais, Marco Antonio e Maria Teresa, meu irmão Marco Aurélio, meus avós, Mário, Marilene, Benedito e Benedita (in memoriam) e a minha bisavó Julieta, pelo amor, carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos dedicados aos estudos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido tantas alegrias e oportunidades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Jr., por esses 8 anos de aprendizado, pela paciência, confiança e amizade.

Aos meus familiares, pelas orações, pelo carinho, por todo o incentivo e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos professores do curso de graduação que contribuíram e ainda contribuem para o meu constante aprendizado, em especial à Profa. Dra. Paula Chiarello, que permitiu a minha participação no ambulatório de Nutrição das Doenças Hepáticas e Metabólicas do Hospital das Clínicas.

Aos amigos de Pós-Graduação Paula Ovídio, Gabriela Castro e Daphne Leonardi Carvalho pelo apoio, pela amizade, pelo auxílio nas análises e pelo conforto nas horas de desespero, a Amanda Canale, Nilian Souza, Patrícia Contri, Mirele Mialich Grecco, Rafael Deminice, Helena Vassimon, Flávia Rosa e Izabel Leme pelo apoio, pela amizade e pelos inesquecíveis momentos de descontração.

Agradeço a José Eduardo Bueno e Marina Dias pelas dicas e auxílio nas análises, em especial a Guilherme Portari por sua grande contribuição durante a iniciação científica e também no início deste estudo.

Aos técnicos do Biotério de Clínica Médica, Adalberto Verceze, Maurício

Arantes e Roni Charles pela dedicação e agradável convívio.

As minhas queridas amigas Ana Paula Sanches, Mariana Mathias e Thaís de Oliveira que me acompanham desde o primeiro dia de graduação, a Paula Valéria Domingues pela amizade mantida apesar de diferentes caminhos percorridos e as amigas que são meu porto seguro desde os 15 anos de idade Paula Campos e

Danielle Marques.

Ao Carlos Eduardo por todo seu amor, carinho, apoio, paciência, companheirismo e por fazer menos árdua a caminhada em busca dos meus sonhos.

As amigas de trabalho Priscila Mason, Daniela Pallos e Ana Cláudia Buzi pelo incentivo e pelas palavras de carinho.

Ao departamento de Clínica Médica pela oportunidade de realizar este estudo.

Ao Emerson, da Secretaria de Pós-Graduação da Clínica Médica pela atenção disponibilizada.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Resumo

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica é caracterizada pelo acúmulo hepático de lipídeos, principalmente na forma de triglicerídeos. Devido à atividade inflamatória progressiva pode evoluir para uma forma mais grave, a esteatohepatite não alcoólica. Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 são associados a efeitos metabólicos positivos para redução da esteatose hepática, no entanto, são mais susceptíveis a peroxidação lipídica. Os triglicerídeos de cadeia média (TCMs) promovem a prevenção do bloqueio da β -oxidação de ácidos graxos e redução da peroxidação lipídica, no entanto os efeitos na redução da esteatose ainda são controversos. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar as implicações da dieta hiperlipídica (HL⁺) com óleo de peixe ou com óleo de TCM no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos hepáticos e no estresse oxidativo em ratos. **Metodologia:** Cinquenta ratos machos da linhagem *wistar* foram divididos em 5 grupos. Os animais receberam água e comida a vontade durante 45 dias. A adaptação a dieta HL⁺ foi realizada nos primeiros 15 dias. A composição da dieta do grupo que recebeu somente a gordura animal (HL⁺GA) era de 50% de gordura animal, e a dieta dos grupos HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP era composta por 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente. **Resultados:** Todos os grupos que receberam as dietas hiperlipídicas apresentaram maior acúmulo de gordura total e de triglicerídeos hepáticos e somente os grupos HL⁺GA e HL⁺TCM apresentaram maior acúmulo de colesterol total hepático em relação ao controle. O grupo HL⁺TCM apresentou maior acúmulo percentual de gordura e um exacerbado acúmulo de triglicerídeos hepáticos em relação aos grupos alimentados com as dietas HL⁺. A redução do colesterol total sérico foi observada nos grupos HL⁺TCM e HL⁺OP, comparados ao controle. A maior incorporação hepática dos ácidos graxos EPA e DHA no grupo HL⁺OP contribuiu para o aumento do Índice de Peroxibilidade dos ácidos graxos e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico livres e totais e para a depleção da vitamina E no fígado. A maior razão Σ AGS/ Σ AGPI hepática observada no grupo HL⁺TCM contribuiu para a preservação dos antioxidantes hepáticos. A alanina aminotransferase, um marcador de dano hepático, apresentou-se aumentada em todos os grupos que receberam as dietas HL⁺. **Conclusões:** A dieta hiperlipídica foi eficiente na indução do acúmulo de gordura hepática. O uso do óleo de TCM foi associado a uma maior concentração de lipídeos e preservação dos antioxidantes hepáticos. A dieta hiperlipídica com óleo de peixe foi associada ao aumento significativo na peroxidação lipídica, apesar do menor acúmulo de colesterol e triglicerídeos hepáticos.

Palavras-chave: esteatose hepática não alcoólica, dieta hiperlipídica, ácidos graxos poli-insaturados ômega-3; triglicerídeos de cadeia média; ratos.

Abstract

Introduction: The Non-alcoholic Fatty liver disease is characterized by hepatic accumulation of lipids, mainly in the form of triglycerides. The disease may progress to a more severe form, the Non-alcoholic steatohepatitis, due to progressive inflammatory activity. Many authors have shown positive metabolic effects associated with the use of polyunsaturated omega-3 fatty acids and reduction in hepatic steatosis. However, these fatty acids are more susceptible to lipid peroxidation. The medium chain triglycerides (MCTs) are able to block β -oxidation of fatty acids and reduce lipid peroxidation, but the MCT effects in steatosis are still controversial.

Objective: The aim of this study was to assess the implications of high-fat diet (HF⁺) with fish oil or with MCT oil in the development of hepatic steatosis, liver fatty acid profile and oxidative stress markers in rats. **Methodology:** Fifty *wistar* male rats were divided into 5 groups. The animals had free access to food and water for 45 days. The first 15 days was dedicated for adaptation to high-fat diet. The HF⁺AF group received high-fat diet with 50% of animal fat and the other high-fat diets were made with 35% of animal fat plus 15% of other types of fat: soybean oil (HF⁺SO), MCT oil (HF⁺MCT) and fish oil (HF⁺FO). **Results:** The high-fat groups had higher hepatic total fat and triglycerides accumulation and only the groups HF⁺AF and HF⁺MCT had higher accumulation of hepatic cholesterol compared to control. The HF⁺MCT group had the highest percentage of hepatic fat accumulation and an exacerbated triglyceride accumulation in the liver among HF⁺ groups. The serum total cholesterol decreased in groups HF⁺MCT and HF⁺FO compared with the control group. The highest incorporation of hepatic fatty acids EPA and DHA in the HF⁺FO group contributed to the increased fatty acids peroxidizability index and total and free hepatic TBARS and depletion of hepatic vitamin E. The biggest ratio Σ SFA/ Σ PUFA of liver fatty acids observed in the HF⁺MCT group contributed to the preservation of hepatic antioxidants. The alanine aminotransferase is a liver damage marker and was increased in all high-fat groups. **Conclusions:** The high-fat diet was effective to increase the hepatic fat concentration. The consumption of MCT oil can increase the hepatic lipid concentration and hepatic antioxidants. There was a significant increase in hepatic lipid peroxidation in the HF⁺FO group, although hepatic cholesterol and triglycerides were decreased.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease, high fat diet, polyunsaturated omega-3 fatty acids; medium-chain triglycerides; rats.

Lista de Figuras

Figura 1. Efeitos das espécies reativas ao oxigênio na inflamação e no dano hepático.	28
Figura 2. Diagrama da estrutura do ácido docosahexaenóico (DHA- 22:6 n-3).	32
Figura 3. Vias de metabolização dos ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3.	34
Figura 4. Hidrólise e absorção dos triglicerídeos de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal.	39
Figura 5. Índice de peroxidabilidade dos óleos de soja, peixe e TCM e da gordura animal utilizados na dieta experimental.	63
Figura 6. Valores de Vitamina E na gordura animal e nos óleos utilizados nas dietas (nmol/mL).	65
Figura 7. Ganho de peso(g) e ingestão energética (Kcal) por semana dos animais do grupo Controle	69
Figura 8. Ganho de peso(g) e ingestão energética (Kcal) por semana dos animais do grupo HL ⁺ GA	70
Figura 9. Ganho de peso(g) e ingestão energética (Kcal) por semana dos animais do grupo HL ⁺ OS	71
Figura 10. Ganho de peso(g) e ingestão energética (Kcal) por semana dos animais do grupo HL ⁺ TCM.	72
Figura 11. Ganho de peso(g) e ingestão energética (Kcal) por semana dos animais do grupo HL ⁺ OP	73

Figura 12. Percentual de gordura hepática (%).	78
Figura 13. Valores médios de colesterol total hepático (mg/g Tecido).....	80
Figura 14. Valores médios de triglicerídeos hepático (mg/g Tecido).	81
Figura 15. Correlação linear entre o índice de peroxibilidade e a razão entre a somatória de ácidos graxos saturados e ácidos graxos poli-insaturados hepáticos. 92	

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/100g).	46
Tabela 2. Composição percentual em ácidos graxos dos óleos de soja, peixe, TCM e gordura animal utilizados nas dietas experimentais.	62
Tabela 3. Estimativa do conteúdo de Vitamina E nas dietas consumidas pelos animais (nmol/g dieta).....	65
Tabela 4. Peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais (g).....	66
Tabela 5. Consumo médio semanal de dietas pelos animais (g).....	68
Tabela 6. Ingestão Alimentar Diária (g/dia), Ingestão Energética Diária (Kcal/dia), Ganho de Peso Diário (g/dia) e Taxa de Eficiência da Dieta.....	75
Tabela 7. Valores médios de peso hepático (g) e da razão entre o peso hepático e peso corporal e quantidades médias de gordura hepática (mg/g Tecido).....	77
Tabela 8. Valores médios de colesterol total e triglicerídeos séricos (mg/dl).....	82
Tabela 9. Porcentagem média de ácidos graxos saturados de cadeia média hepáticos.....	86
Tabela 10. Porcentagem média de ácidos graxos saturados de cadeia longa hepáticos.....	87
Tabela 11. Porcentagem média de ácidos graxos monoinsaturados hepáticos.....	88

Tabela 12. Porcentagem média de ácidos graxos poli-insaturados n-6 hepáticos.....	89
Tabela 13. Porcentagem média de ácidos graxos poli-insaturados n-3 hepáticos.....	90
Tabela 14. Somatórias do percentual de ácidos saturados de cadeia média e longa, somatória do percentual ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6, razão entre ácidos graxos da via ômega-6 e da via ômega-3 e razão entre a somatória do percentual de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, e índice de peroxidabilidade da dieta.....	91
Tabela 15. Estimativa da atividade das enzimas de dessaturação verificadas pelas razões entre ácidos graxos hepáticos.....	94
Tabela 16. Médias de valores de peroxidação lipídica sérica e hepática observada através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico livres e totais (nmol/g Proteína).....	96
Tabela 17. Valores médios de glutathione reduzida sérica e hepática (nmol/g Proteína) e vitamina E hepática (nmol/g Tecido e nmol/g Gordura) como indicadores do sistema antioxidante.....	98
Tabela 18. Concentrações médias séricas de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase apresentadas pelos grupos.....	99

Lista de Siglas

AGMIs – Ácidos graxos monoinsaturados.

AGPIs – Ácidos graxos poli-insaturados.

AGSCLs – Ácidos graxos saturados de cadeia longa.

AGSCMs – Ácidos graxos saturados de cadeia média.

AGSs – Ácidos graxos saturados.

AGSs – Ácidos graxos saturados.

ALA – Ácido α -linolênico.

ALT – Alanina aminotransferase.

ARA – Ácido Araquidônico.

AST – Aspartato aminotransferase.

CPT – Carnitina palmitoil transferase.

DHA – Ácido Docosahexaenóico.

DM2 – Diabetes Melitus tipo 2.

EPA – Ácido Eicosapentaenóico.

EROs – Espécies reativas ao oxigênio.

GLUT-4 – Transportador de Glicose tipo 4

GPR120 - Receptor acoplado a proteína G

GSH – Glutathione reduzida.

HDL – Lipoproteína de alta densidade.

HL⁺ - Hiperlipídica.

IL- 6 – Interleucina – 6.

IL-1 β - Interleucina -1 β .

IL-8 - Interleucina – 8.

IP – Índice de peroxidabilidade.

JNK – Quinase Jun N-terminal

LA – Ácido linoléico.

LDL – Lipoproteína de baixa densidade.

LTs - Leucotrienos

MDA – Malonaldeído.

n-3 - Ácido graxo poli-insaturado ômega-3.

n-6 - Ácido graxo poli-insaturado ômega-6.

NAFLD – Doença hepática gordurosa não alcoólica.

NASH – Esteatohepatite não alcoólica.

NF κ B – Fator Nuclear κ B

PGs – Prostaglandinas

PPAR α - Receptores alfa ativados por proliferadores de peroxissomo.

RI – Resistência à insulina.

SI – Síndrome Metabólica.

SRATB – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

SREBP -1c - Proteína 1c ligadora do elemento responsivo ao esterol.

TCL – Triglicerídeo de cadeia longa.

TCM – Triglicerídeo de cadeia média.

TED – Taxa de eficiência da dieta.

TG – Triglicerídeos.

TNF- α – Fator de necrose tumoral.

TXs – Tromboxanos

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade.

Lista de Ácidos Graxos

C8:0	Ácido Caprílico
C10:0	Ácido Cáprico
C12:0	Ácido Láurico
C14:0	Ácido Mirístico
C15:0	Ácido Pentadecanóico
C16:0	Ácido Palmítico
C16:1	Ácido Palmitoléico
C17:0	Heptadecanóico
C18:0	Ácido Esteárico
C18:1n-9c	Ácido Oléico
C18:2n-6c	Ácido Linoléico
C18:3n-6	Ácido γ -Linolênico
C18:3n-3	Ácido α -Linolênico
C20:1n9	Ácido Eicosanóico
C20:2n6	Ácido Eicosadienóico
C20:3n-3	Ácido Eicosatrienóico
C20:3n-6	Ácido Di-homo-linolênico
C20:4n-6	Ácido Araquidônico
C20:5n-3	Ácido Eicosapentaenóico
C22:1n9	Ácido Erúcico
C22:6n-3	Ácido Docosahexaenóico

C23:0	Ácido Tricosanóico
-------	--------------------

C24:0	Ácido Lignocérico
-------	-------------------

C24:1n9	Ácido Nervônico
---------	-----------------

Sumário

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Siglas	
Lista de Ácidos graxos	
1. Introdução	23
1.1. <i>Dieta hiperlipídica e NAFLD</i>	30
1.2. <i>Aspectos dietéticos abordados no tratamento da NAFLD</i>	31
1.3. <i>O uso dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na NAFLD</i>	32
1.4. <i>O uso dos triglicerídeos de cadeia média na NAFLD</i>	38
2. Objetivos	423
2.1. <i>Objetivo geral</i>	43
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	43
3. Material e métodos	45
3.1. <i>Animais e dietas</i>	45
3.1.1. <i>Dieta</i>	45
3.1.2. <i>Animais</i>	46
3.2. <i>Análises bioquímicas</i>	47
3.2.1. <i>Determinação da gordura hepática total</i>	47
3.2.2. <i>Determinação dos ácidos graxos</i>	48
3.2.2.1 <i>Determinação de ácidos graxos hepáticos</i>	49
3.2.2.2 <i>Determinação de ácidos graxos dos óleos e gorduras das dietas experimentais</i>	50
3.2.3. <i>Determinação de colesterol total e triglicérides hepáticos e séricos</i>	50
3.2.3.1. <i>Determinação do colesterol total</i>	51
3.2.3.2 <i>Determinação de triglicerídeos</i>	51

3.2.4.	<i>Determinação da proteína sérica e hepática.....</i>	52
3.2.5.	<i>Determinação da peroxidação lipídica sérica e hepática.....</i>	52
3.2.6.	<i>Determinação de glutathione reduzida (GSH) hepática e sérica</i>	53
3.2.7.	<i>Determinação de vitamina E hepática e dos óleos e da gordura utilizada na dieta.....</i>	54
3.2.8.	<i>Determinação das concentrações séricas das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)</i>	55
3.2.9.	<i>Cálculos</i>	56
3.2.9.1.	<i>Cálculo do ganho de peso total, ganho de peso e consumo de dieta semanal, estimativa de ingestão dos óleos e da gordura animal por semana, estimativa do ganho de peso e consumo de dieta diários, e cálculo da taxa de eficiência da dieta (TED).....</i>	56
3.2.9.2.	<i>Cálculo do índice de peroxidabilidade da dieta e dos ácidos graxos hepáticos.....</i>	57
3.2.9.3.	<i>Cálculo da estimativa da atividade das enzimas de dessaturação no fígado</i>	57
3.2.10.	<i>Análise estatística</i>	58
4.	<i>Resultados</i>	60
4.1	<i>Composição dos óleos e gordura utilizados no preparo das dietas.....</i>	60
4.1.2	<i>Perfil de ácidos graxos dos óleos e da gordura utilizados no preparo das dietas.....</i>	60
4.1.3.	<i>Índice de peroxidabilidade dos óleos e da gordura utilizados no preparo das dietas.....</i>	63
4.1.4.	<i>Vitamina E dos óleos e da gordura animal utilizados nas dietas</i>	64
4.2.	<i>Crescimento dos animais e Ingestão de dieta e energética por semana..</i>	66
4.3.	<i>Ganho de peso, ingestão alimentar e energética diários e taxa de eficiência da dieta.....</i>	74
4.4.	<i>Peso hepático e acúmulo de gordura hepática</i>	76
4.5	<i>Colesterol e triglicerídeos séricos e hepáticos</i>	79

4.6.	<i>Perfil dos ácidos graxos hepáticos e índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos</i>	83
4.7.	<i>Razão entre a somatória dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados e índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos.....</i>	92
4.8.	<i>Estimativa da atividade das enzimas de dessaturação hepáticas</i>	93
4.9.	<i>Peroxidação lipídica.....</i>	95
4.10.	<i>Componentes do sistema antioxidante</i>	97
4.11.	<i>Transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....</i>	99
5.	Discussão.....	101
6.	Conclusões.....	125
	Referências Bibliográficas.....	127
	Apêndice.....	138
	Apêndice A - Evolução semanal das médias de peso dos animais (g).....	139
	Apêndice B - Estimativa de ingestão dos óleos e gordura das dietas por semana.....	140
	Apêndice C - Porcentagem média de outros ácidos graxos hepáticos	141
	Anexo.....	142
	Anexo 1 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	138

Introdução

1. Introdução

O termo esteatohepatite não alcoólica (NASH- Non Alcoholic Steatohepatitis) foi utilizado pela primeira vez em 1980, por Ludwig e colaboradores, para se referir aos achados histopatológicos similares a doença hepática alcoólica que ocorre em indivíduos sem história significativa de consumo de álcool (<20g/dia para mulheres e <30g/dia para homens) com exclusão de outras causas como drogas e toxinas (Zivkovic, German et al. 2007; 2011).

O estágio inicial da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD- Non Alcoholic Fat Liver Disease) é caracterizado pelo acúmulo hepático de lipídeos, principalmente na forma de triglicerídeos (TG). Devido à atividade inflamatória progressiva, a doença pode evoluir a esteatohepatite não alcoólica (NASH), caracterizada pela presença de esteatose e inflamação (Grattagliano, Portincasa et al. 2007). O terceiro e quarto estágio são a forma mais grave da NASH, em que a esteatose está associada ao dano hepatocelular, e à presença de fibrose e/ou corpúsculos de Mallory, respectivamente (Zivkovic, German et al. 2007; Castro, Almeida et al. 2008). A doença pode evoluir para a cirrose e carcinoma hepatocelular, levando à falência hepática (Sheth, Gordon et al. 1997).

A obesidade, a resistência à insulina (RI), incluindo o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), e outras situações patológicas como a Síndrome Metabólica (SM), os níveis de triglicérides elevados e redução na HDL_{colesterol} são fatores de risco fortemente associados ao desenvolvimento da NAFLD e também para a progressão à NASH (Parekh and Anania 2007; Cotrim, Parise et al. 2011).

A prevalência da NAFLD na população ocidental é estimada entre 20 e 30% e em cerca de 90% em indivíduos obesos mórbidos. Já o diagnóstico da NASH é menos comum, com prevalência estimada de 2 a 3%, que é maior em indivíduos obesos mórbidos (37%) (Dowman, Tomlinson et al. 2010).

No Brasil, um recente estudo, realizado com 1280 pacientes com o diagnóstico de NAFLD, identificou que destes, 41,9% apresentavam a esteatose isolada, 31,1% a esteatohepatite e 27% apresentavam a esteatohepatite associada a fibrose e cirrose (Cotrim, Parise et al. 2011). Outro estudo relata a associação da NASH com cerca de 13% dos casos de carcinoma hepatocelular (Dowman, Tomlinson et al. 2010).

Os indivíduos portadores da esteatose hepática são, em maior parte, assintomáticos e somente cerca de 20-50% apresentam alteração nas transaminases (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST), o que pode dificultar o diagnóstico da doença (Tessari, Coracina et al. 2009; Cotrim, Parise et al. 2011). A biópsia hepática é o método padrão ouro para a identificação do grau da infiltração de lipídeos e a presença de inflamação e fibrose (Cave, Deaciuc et al. 2007). Atualmente, a associação de fatores de risco com a fibrose avançada está sendo investigada para a determinação de escores que englobam idade ≥ 50 anos, obesidade, DM 2, RI, hiperlipidemia, ALT ≥ 30 e razão AST/ALT $\geq 0,8-1,0$ como alternativa não invasiva de diagnóstico da NASH (Sumida, Yoneda et al. 2010; Pulzi, Cisternas et al. 2011; Younossi ZM, Page S et al. 2011).

A primeira hipótese para descrever o mecanismo de patogênese da progressão da NAFLD a NASH foi proposta em 1998, por Day & James, segundo a teoria dos dois “hits”. O primeiro “hit” consiste no próprio acúmulo hepático de lipídeos que, conseqüentemente, promove um aumento da vulnerabilidade do

hepatócito à ocorrência do segundo “hit”. Este consiste na produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, que contribuem para a inflamação, fibrose e morte celular (Nagata, Suzuki et al. 2007; Gentile and Pagliassotti 2008; Dowman, Tomlinson et al. 2010).

O acúmulo de lipídios no hepatócito pode ocorrer devido a um desequilíbrio no *turnover* dos triglicerídeos, resultante de um aumento do fluxo hepático de ácidos graxos provenientes tanto da dieta quanto da lipólise periférica, aumento do estímulo da síntese hepática de triglicerídeos a partir da glicose, frutose e aminoácidos por meio da *síntese de novo* de ácidos graxos (Samuel, Liu et al. 2004; Cai, Yuan et al. 2005; Cave, Deaciuc et al. 2007) e em contrapartida, pela ineficiente oxidação e transporte de lipídeos hepáticos (Vanni, Bugianesi et al. 2010).

Nos indivíduos com NAFLD o aumento na síntese de VLDL pode estar prejudicada (Zivkovic, German et al. 2007; Vanni, Bugianesi et al. 2010), devido a redução da síntese da apolipoproteína B (ApoB), com conseqüente redução do transporte extra hepático pelas partículas de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Wang, Wei et al. 2006; Zou, Li et al. 2006; Parekh and Anania 2007). O excesso de lipídeos no hepatócito resulta em extensiva oxidação mitocondrial e aumento da produção de radicais livres levando à disfunção mitocondrial e consequentemente na insuficiente oxidação de ácidos graxos (Samuel, Liu et al. 2004; Vanni, Bugianesi et al. 2010; Vial, Dubouchaud et al. 2011).

A ação da insulina promove uma supressão na lipólise do tecido adiposo, no entanto, nos casos em que pode se observar a resistência à insulina, como na NAFLD, a supressão não ocorre e resulta no aumento do fluxo hepático de ácidos graxos livres (Cai, Yuan et al. 2005; Cave, Deaciuc et al. 2007; Dowman, Tomlinson et al. 2010). A conseqüente hiperinsulinemia contribui para a maior síntese hepática

de triglicerídeos, pois está relacionada ao maior estímulo da SREBP-1c, fator nuclear que regula a transcrição de genes que atuam na lipogênese e também na inibição da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, favorecendo o acúmulo hepático (Samuel, Liu et al. 2004; Cave, Deaciuc et al. 2007; Dowman, Tomlinson et al. 2010).

O aumento dos ácidos graxos não esterificados hepáticos promove aumento concomitante dos diacilgliceróis, precursores intermediários dos triglicerídeos (Vanni, Bugianesi et al. 2010), que são associados à redução da sinalização da insulina no fígado devido à redução da ativação dos substratos receptores de insulina e da atividade dos transportadores de glicose (Preiss and Sattar 2008). A lipotoxicidade dos ácidos graxos livres é demonstrada pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, inibição da β -oxidação mitocondrial, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a indução da apoptose no hepatócito (Dowman, Tomlinson et al. 2010; Vanni, Bugianesi et al. 2010).

O aumento do estresse oxidativo é um fator central na patogênese da NASH e está associado à inibição da replicação dos hepatócitos maduros que resulta no aumento das células progenitoras não diferenciadas e células ovas, estreitamente correlacionadas com o estado fibrótico e ao carcinoma hepatocelular, devido à redução do potencial de regeneração das células hepáticas (Naves & Moreno 2000; Dowman, Tomlinson et al. 2010).

Nos hepatócitos, a resistência à insulina e o excesso de ácidos graxos livres prejudicam a oxidação mitocondrial de ácidos graxos, que acumulam e contribuem para a geração de radicais livres através da ativação das vias metabólicas do peroxissomo e microssomo (Grattagliano, Portincasa et al. 2007). O estresse oxidativo e a subsequente peroxidação lipídica promovem o dano da membrana

plasmática, tornando-a vulnerável à apoptose e favorecendo a resposta inflamatória (Cave, Deaciuc et al. 2007; Oliveira, Coelho et al. 2006).

A mitocôndria é responsável pela fosforilação oxidativa e pela β -oxidação de ácidos graxos (Dowman, Tomlinson et al. 2010; Vanni, Bugianesi et al. 2010). A disfunção mitocondrial ocorre por consequência do aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica que resultam na toxicidade e alteração do DNA mitocondrial (Vanni, Bugianesi et al. 2010). A alteração estrutural da mitocôndria observada no NASH promove uma inibição da β -oxidação, no fluxo de elétrons e da atividade da cadeia respiratória, o que favorece ainda mais o acúmulo de lipídeos e de radicais livres (Cave, Deaciuc et al. 2007; Dowman, Tomlinson et al. 2010).

O retículo endoplasmático é uma organela intracelular responsável pela síntese de proteínas, triglicerídeos e colesterol. O estresse do RE está associado a um ciclo no desenvolvimento da esteatose, já que o aumento do fluxo de ácidos graxos resulta em uma sobrecarga e estresse do RE e este pode agravar o acúmulo hepático de lipídeos, devido à ativação das vias JNK e NF- κ B que resultam em apoptose, ativação das vias pró-inflamatórias, resistência à insulina e disfunção mitocondrial (Dara, Ji et al. 2011).

Em indivíduos com NASH verifica-se o aumento na concentração sérica do RNAm hepático e do RNAm do receptor hepático de TNF- α e também mostra-se aumentada a produção citocinas inflamatórias por monócitos (Cave, Deaciuc et al. 2007). As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β , promovem o recrutamento e ativação das células de Kupffer e a transformação das células esteladas em miofibroblastos e estão envolvidas na redução da sinalização da insulina e na produção do tecido fibrótico (Cave, Deaciuc et al. 2007; Vanni, Bugianesi et al. 2010).

Os efeitos das espécies reativas ao oxigênio no dano hepático e inflamação são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Efeitos das espécies reativas ao oxigênio no dano hepático e inflamação. Adaptado de Tessari et al (2009) Abreviações: AOX, acil-CoA oxidase; MRC, cadeia respiratória mitocondrial; CYP, citocromo P450; HNE, trans-4-hidroxi-2-nonenal; MDA, malonaldeído.

A redução dos níveis de adiponectina e aumento do TNF- α são fatores preditores independentes da progressão ao NASH. A adiponectina tem potencial anti-inflamatório (Dowman, Tomlinson et al. 2010) e a redução dos níveis plasmáticos encontrada em indivíduos com NASH é associada ao aumento da resistência à insulina, conteúdo hepático de gordura e aumento da atividade inflamatória (Cave, Deaciuc et al. 2007; Parekh and Anania 2007; Vanni, Bugianesi et al. 2010). Os níveis aumentados de leptina promovem uma redução da sinalização à insulina, pois inativa os seus receptores através da defosforilação, induzindo uma resistência periférica e hepática (Samuel, Liu et al. 2004; Cai, Yuan et al. 2005; Dowman, Tomlinson et al. 2010) e também é associada aos níveis hepáticos de lipídeos, à inflamação e à fibrose (Vanni, Bugianesi et al. 2010).

1.1. Dieta Hiperlipídica e NAFLD

A dieta hiperlipídica (HL⁺), definida por conteúdo $\geq 30\%$ de energia proveniente de gordura (Hariri and Thibault 2010), é comumente empregada como modelo experimental para indução da esteatose hepática através da superalimentação (Larter and Yeh 2008).

O aumento do fluxo hepático de lipídios resultante do excesso de gordura proveniente da dieta hiperlipídica está associado ao primeiro “hit” no desenvolvimento da NAFLD (Ahmed, Redgrave et al. 2009). A esterificação a triglicerídeos é proporcional a disponibilidade de ácidos graxos que associada a uma redução na capacidade de utilização, contribui para maior acúmulo hepático (Anstee and Goldin 2006; Ahmed, Redgrave et al. 2009).

A elevada ingestão dietética de gordura, principalmente proveniente de ácidos graxos saturados (AGSs), desempenha um importante papel no desenvolvimento da NASH (Vanni, Bugianesi et al. 2010). O aumento do fluxo hepático de lipídeos promove uma lipotoxicidade, associada a um elevado nível de estresse oxidativo e redução da defesa antioxidante (Jian-gao and Qiao 2009). O estresse oxidativo e a ativação de citocinas inflamatórias atuam como o segundo “hit” da evolução esteatose para a esteatohepatite (Ahmed, Redgrave et al. 2009).

Conforme demonstrado no estudo de Gentile e Pagliassotti (2008) a dieta rica em gordura saturada promove o estímulo de citocinas pró-inflamatórias, aumento das espécies reativas ao oxigênio, estresse do retículo endoplasmático e dano do hepatócito.

1.2. Aspectos dietéticos abordados no tratamento da NAFLD

As investigações para a dietoterapia da NASH são focadas na redução do estresse oxidativo e na melhora da resistência à insulina (Parekh and Anania 2007).

As alterações dietéticas recomendadas são baseadas nos fatores de risco associados à NAFLD e também nas recomendações para melhora do controle glicêmico, dislipidemia e redução do risco cardiovascular (Zivkovic, German et al. 2007). Além da elevada ingestão de gordura saturada e colesterol, a menor ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) n-3 e maior ingestão de gordura total (maior razão entre os ácidos graxos n-6/n-3) são associadas com a inflamação hepática (Tessari, Coracina et al. 2009). Portanto, as recomendações consistem na limitação do consumo de carboidratos simples e na redução do consumo de gordura saturada (Cave, Deaciuc et al. 2007; Zivkovic, German et al. 2007) associada a um aumento da ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMIs) e poli-insaturados ômega-3 (Zivkovic, German et al. 2007; Harrison 2008).

A perda de peso recomendada é cerca de 5-10% (Vanni, Bugianesi et al. 2010) para a melhora na resistência à insulina e redução da esteatose hepática (Cave, Deaciuc et al. 2007; Parekh and Anania 2007).

Atualmente discute-se a ação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e de triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática.

1.3. O uso dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na NAFLD

Os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 são essenciais para o organismo humano devido à incapacidade da biosíntese *de novo* dos AGPIs linoleato (18:2n-6) e linolenato (18:3n-3) (Tocher, Bell et al. 2001) e devido à ausência da ω -3 dessaturase nos mamíferos que impossibilita a interconversão entre os intermediários das vias n-3 e n-6 (Meyer, Kirsch et al. 2004).

A nomenclatura n-3 é baseada na posição da ligação dupla no terceiro carbono relativo ao terminal metil da molécula de ácido graxo (Ruxton, Reed et al. 2007; Schmitz and Ecker 2008).

A Figura 2, a seguir, ilustra a nomenclatura do DHA.

Figura 2. Diagrama da estrutura do Ácido Docosahexaenóico (DHA- 22:6 n-3). Adaptado de Ruxton et al (2007).

As principais fontes alimentares de ômega-3 são os peixes marinhos, como salmão, truta e atum, que contém principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (Schmitz and Ecker 2008) e os óleos vegetais como da linhaça e canola, que contém o ácido α -linolênico (Arterburn, Hall et al. 2006; Schmitz and Ecker 2008).

A metabolização dos AGPIs ocorre no retículo endoplasmático hepático por ação de enzimas enlongases e dessaturases (Arterburn, Hall et al. 2006; Schmitz and Ecker 2008). Os Ácidos Eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e Docosahexaenóico (C22:6 n-3) são sintetizados a partir do precursor Ácido α -linolênico (ALA) (C18:3n-3), enquanto o Ácido Araquidônico (ARA) (C20:4 n-6) é sintetizado a partir do Ácido Linoléico (LA) (C18:2 n-6) (Arterburn, Hall et al. 2006; Ruxton, Reed et al. 2007; Schmitz and Ecker 2008). Na conversão final do ALA a DHA é necessário uma translocação ao peroxissomo para uma reação oxidativa, devido a ausência da delta-4-dessaturase nos mamíferos (Meyer, Kirsch et al. 2004; Arterburn, Hall et al. 2006).

A enzima delta-6-dessaturase participa tanto da metabolização do ácido linoléico como do ácido linolênico e, portanto há uma competição de substrato (Schmitz and Ecker 2008). A dieta rica em ácido linoléico reduz a conversão do ácido linolênico nos seus derivados em torno de 40% (Arterburn, Hall et al. 2006).

As vias de metabolização dos ácidos graxos são apresetadas na Figura 3, a seguir.

Figura 3. Vias de Metabolização dos Ácidos Graxos Poli-insaturados n-6 e n-3.
 Adaptada de Schmitz e Ecker (2008).

Os ácidos graxos são armazenados na forma esterificada nos fosfolípidos das membranas celulares (Schmitz and Ecker 2008). O EPA, DHA, ALA e também o ARA competem pela mesma posição na membrana de fosfolípidios (Arterburn, Hall et al. 2006). Os AGPIs promovem propriedade de fluidez de membrana, que influencia a atividade das enzimas e receptores ligados a membrana promovendo a regulação da sinalização celular (Das 2006; Pickova 2009). Sendo assim, a composição da membrana determina a síntese de eicosanóides que irão resultar em uma variedade de processos biológicos (Das 2006; Schmitz and Ecker 2008).

O EPA e o ARA também competem pelas mesmas enzimas ciclooxygenase e lipoxigenase (Riediger, Othman et al. 2009). Desta forma, a maior concentração de EPA e DHA resulta na menor produção de eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias (Saw, Huang et al. 2010) e o potencial anti-inflamatório é resultante da maior produção de Leucotrienos série 5 e Resolvinas (Schmitz and Ecker 2008; Riediger, Othman et al. 2009).

Os ácidos graxos n-3 também podem atuar na expressão gênica de receptores nucleares que direta ou indiretamente modulam os genes envolvidos no metabolismo de lipídios (Levy, Clore et al. 2004; Schmitz and Ecker 2008). A indução do PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor - receptores alfa ativados por proliferadores de peroxissomo) promove um estímulo na oxidação de lipídeos (Schmitz and Ecker 2008) e a inibição da SREBP-1c (sterol responsive element-binding protein - proteína 1c ligadora do elemento responsivo ao estero) resulta na redução da transcrição de genes de enzimas lipogênicas (Ácido Graxo Sintase e Estearoil CoA dessaturase) (Schmitz and Ecker 2008).

Os efeitos do EPA e DHA na redução nos níveis de triglicerídeos sanguíneos, melhora na sensibilidade à insulina e redução da produção de citocinas pró-inflamatórias podem ser benéficos na NAFLD (Tessari, Coracina et al. 2009; Byrne 2010).

Experimentos com animais demonstram o papel dos ácidos graxos poli-insaturados n-3 na regulação da síntese e oxidação de lipídeos (Kramer, LeDeaux et al. 2003) que resultam na redução da esteatose hepática e da inflamação (El-Badry, Graf et al. 2007; Saraswathi, Gao et al. 2007). O estudo de Levy & Clore (2004) demonstrou a redução dos níveis de triglicerídeos hepáticos em animais alimentados com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 comparada à dieta rica em gordura saturada. O efeito benéfico do uso do óleo de peixe na redução do acúmulo hepático de lipídeos em indivíduos com esteatose hepática associada à melhora dos lipídeos séricos e nos níveis de ALT é demonstrado em vários estudos (Sealls, Gonzalez et al. 2008; Zhu, Liu et al. 2008).

As dietas ricas em óleo de peixe previnem o acúmulo lipotóxico de triglicerídeos em tecidos sensíveis à insulina e promovem um aumento na sensibilidade à insulina em roedores (Storlien, Kraegen et al. 1987). Outro estudo relata a associação entre a redução da esteatose hepática, indução do PPAR- α e inibição do SREBP-1, e a melhora na sensibilidade a insulina nos animais que ingeriram a dieta hiperlipídica rica em óleo de peixe (Buettner, Parhofer et al. 2006). Oh et al (2010) demonstrou que a ativação do GPR120 (G protein-coupled receptor – receptor acoplado a proteína G) pelos AGPI n-3 resulta em potente efeito anti-inflamatório, melhora na sensibilidade à insulina e redução do acúmulo de lipídeos hepáticos em ratos obesos alimentados com a dieta hiperlipídica.

A literatura demonstra efeitos metabólicos positivos associados ao uso dos AGPI n-3 na redução da esteatose hepática. No entanto, os AGPI são mais susceptíveis a peroxidação lipídica (Sugihara, Tsuruta et al. 1994) e poucos estudos avaliam o efeito da suplementação destes ácidos graxos no aumento do estresse oxidativo (Sealls, Gonzalez et al. 2008; Wu, Tong et al. 2011).

1.4. O uso dos triglicerídeos de cadeia média na NAFLD

Os triglicerídios de cadeia média (TCM) consistem em ácidos graxos saturados com comprimento de cadeia de 6 a 12 carbonos (Bach and Babayan 1982). As principais fontes são o óleo de coco e de palmeira (Beermann, Jelinek et al. 2003).

A principal característica dos TCMs é a rápida absorção e metabolização. A absorção ocorre diretamente pelo trato intestinal e posteriormente, são hidrolisados a ácidos graxos de cadeia média e transportados diretamente ao fígado, pela veia porta, ligados a albumina (Beermann, Jelinek et al. 2003; Aoyama, Nosaka et al. 2007).

No fígado, os TCMs são rapidamente oxidados, pois o transporte intramitocondrial não requer a ação da carnitina palmitoil transferase (CPT), uma enzima limitante da taxa da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos (Shinohara, Ogawa et al. 2005).

A Figura 4 ilustra a hidrólise e absorção dos triglicerídeos de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal.

Figura 4. Hidrólise e absorção dos triglicerídeos de cadeia longa e cadeia média no sistema gastrointestinal. Adaptado de Aoyama, Nosaka et al (2007).

Devido a essas características, os TCMs são amplamente utilizados na terapia nutricional parenteral e na síndrome da má absorção intestinal (Beermann, Jelinek et al. 2003; Aoyama, Nosaka et al. 2007).

Os TCMs são associados a um aumento da termogênese, a uma saciedade precoce e à redução da gordura corporal (St-Onge and Jones 2002; Aoyama, Nosaka et al. 2007). No entanto, há controvérsias na literatura sobre o uso dos TCMs no tratamento da obesidade. O estudo de Han et al (2003) relata a redução de gordura corporal, associada a melhora na sensibilidade à insulina e na tolerância a glicose em ratos normais alimentados com TCMs na dieta hiperlipídica. Em indivíduos com sobrepeso/obesidade a associação de 72% de TCM e 22% de AGPI n-3 promoveu a perda de peso e a redução da gordura corporal (Beermann, Jelinek et al. 2003). Em outro estudo mais recente, apesar do aumento da oxidação de lipídeos pós-prandial, não foi observada diferença significativa na perda de peso e composição corporal em indivíduos com sobrepeso/obesidade que consumiram 16g de TCMs/1000Kcal durante 6 semanas, comparado ao óleo de oliva (Roynette, Rudkowska et al. 2008).

Os resultados observados sobre o uso dos TCMs na redução dos lipídeos sanguíneos também são controversos. O estudo de Aoyama et al (2007) demonstra menores níveis de triglicerídeos sanguíneos em indivíduos com IMC $\geq 23\text{Kg/m}^2$ que consumiram 10g de TCM comparado aos que consumiram TCL. A redução do nível sérico de colesterol pode ser observada em um estudo realizado com ratos normais alimentados com o TCM, comparado tanto ao grupo controle quanto aos ratos alimentados com óleo de coco e óleo de milho (Kritchevsky and Tepper 1965). Outro estudo, realizado com homens saudáveis, não observou alteração significativa no

colesterol total, VLDL_{col}, LDL_{col}, HDL_{col} e triglicérides séricos, após 4 semanas de ingestão de 40g de TCM (Nosaka, Kasai et al. 2002). No entanto, a ingestão de 70g de TCM por homens jovens resultou em maiores níveis séricos de colesterol total, VLDL_{col}, LDL_{col}, triglicérides séricos, maior relação LDL/HDL e maiores níveis glicêmicos comparado aos indivíduos que consumiram óleo de girassol (Tholstrup, Ehnholm et al. 2004).

Poucos estudos descrevem o uso do TCM na esteatose hepática não alcoólica. O mecanismo proposto que justifica o uso dos TCMs na esteatose hepática é a prevenção da inibição da β -oxidação de ácidos graxos (Lieber, Cao et al. 2007; Lieber, DeCarli et al. 2008).

Lieber et al (2008) demonstraram um efeito positivo na redução da esteatose hepática não alcoólica em animais alimentados com a dieta hiperlipídica por meio da substituição total dos triglicerídeos de cadeia longa (TCL), pelos TG de cadeia média. No entanto, este mesmo estudo observa que a associação de TCL e TCM na dieta parece promover um maior acúmulo hepático de lipídeos (Lieber, DeCarli et al. 2008). O aumento no acúmulo de triglicerídeos hepáticos nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica rica em TCM também é demonstrado em outros estudos (Geelen, Schoots et al. 1995; Wein, Wolfram et al. 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho visou avaliar os efeitos do uso do óleo de peixe ou dos triglicerídeos de cadeia média no desenvolvimento da esteatose hepática e no estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. *Objetivo Geral*

Avaliar as implicações da dieta hiperlipídica com óleo de peixe ou com triglicerídeos de cadeia média no desenvolvimento da esteatose hepática, no perfil de ácidos graxos hepáticos e no estresse oxidativo em ratos.

2.2. *Objetivos Específicos*

- Avaliar o acúmulo de gordura hepática por meio da determinação da gordura hepática total.
 - Avaliar as alterações no perfil lipídico sérico e hepático através das análises de colesterol total e triglicerídeos.
 - Avaliar a incorporação hepática dos ácidos graxos presentes na dieta, através da determinação do perfil de ácidos graxos hepáticos e a razão entre os ácidos graxos para estimativa da atividade das enzimas de dessaturação no fígado.
 - Avaliação do estresse oxidativo através das SRATB e da defesa antioxidante utilizando como parâmetros a vitamina E e a GSH.
 - Avaliar o índice de peroxidabilidade da dieta e a sua relação com a peroxidação lipídica.
 - Avaliar alterações nas transaminases séricas (AST e ALT), como indicadores de dano hepático.
-

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Animais e dietas

3.1.1. Dieta

A dieta utilizada no estudo foi baseada na recomendação pelo *American Institute of Nutrition*, AIN-93, para roedores em crescimento (Reeves, Nielsen et al. 1993). A dieta hiperlipídica foi obtida por uma adaptação da dieta padrão, com o aumento gradual do conteúdo de lipídeos, passando de 7g/100g de dieta, como preconizado pela AIN-93, para 50g/100g, e com a redução da quantidade de carboidrato passando de 63g/100g de dieta para 20g/100g, sendo que destes 5g são constituídos de sacarose para melhor palatabilidade da dieta. Os componentes restantes da dieta, como as fibras, proteínas, vitaminas e minerais foram mantidos conforme a recomendação da dieta AIN-93.

A dieta do grupo Controle (C) continha 7% de óleo de soja. As dietas hiperlipídicas foram compostas principalmente por gordura saturada. A dieta do grupo que recebeu somente a gordura animal (HL⁺GA), continha 50% de gordura animal, e as dietas dos grupos que receberam o óleo de soja (HL⁺OS), óleo de TCM (HL⁺TCM) e óleo de peixe (HL⁺OP), continham 35% de gordura animal e 15% dos respectivos óleos.

A composição das dietas experimentais consumidas pelos animais é apresentada na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Composição das Dietas experimentais (g/100g).

Ingredientes (g/100g)	Dieta Controle (AIN-93)	Dieta Gordura Animal	Dietas Gordura Animal + Óleos		
			Óleo de Soja	Óleo de TCM	Óleo de Peixe
Amido de milho	53	15	15	15	15
Caseína	20	20	20	20	20
Sacarose	10	5	5	5	5
Óleo de Soja	7	0	15	0	0
Óleo de TCM	0	0	0	15	0
Óleo de Peixe	0	0	0	0	15
Gordura Animal	0	50	35	35	35
Celulose	5	5	5	5	5
Mix Vitaminas	1	1	1	1	1
Mix Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,01	0,01	0,01	0,01
Energia (Kcal)	395	610	610	610	610
Energia- Gordura (%)	16	74	74	74	74

BHT – di-terc-butil metil fenol.

As dietas eram pesadas e repostas três vezes na semana. A quantificação da ingestão de dieta pelos animais foi obtida por pesagem dos comedouros onde a dieta foi ofertada.

3.1.2. Animais

Foram utilizados, no total, 50 ratos machos da linhagem *Wistar* com peso médio de 60 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Os ratos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos à temperatura de 25°C num ciclo claro-escuro de 12 horas.

A pesagem dos animais foi realizada semanalmente para comparação das médias de peso inicial, final e da evolução do peso durante o experimento.

A distribuição dos animais foi realizada em cinco grupos com 10 animais cada, que receberam, durante 45 dias, água e dieta à vontade. Inicialmente os animais passaram por um período de adaptação à dieta padrão, durante 3 dias. Posteriormente, foi realizado o aumento gradual do conteúdo de lipídeos da dieta para a adaptação à dieta hiperlipídica, durante 15 dias. O aumento da quantidade de lipídeos na dieta de adaptação era realizado a cada 3-4 dias, e progrediu do conteúdo inicial de 15g/100g, para 20g/100g, para 35g/100g, até atingir a quantidade desejada na dieta experimental (50g/100g).

Ao fim do experimento os animais foram eutanasiados por decapitação e o fígado e o sangue foram coletados para as análises histológicas e bioquímicas.

O sangue foi prontamente centrifugado a 3500 rpm, à 4°C durante 15 minutos para obtenção do soro. O fígado após ser removido foi pesado e prontamente congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -40°C para posteriores análises bioquímicas.

3.2. Análises bioquímicas

3.2.1. Determinação da gordura hepática total

A determinação da gordura hepática total foi realizada de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959).

O tecido hepático (500mg) foi homogeneizado com 0,8mL de água destilada, em tubos de 10mL e em seguida foi adicionado 2mL de metanol e 1 mL de clorofórmio. As amostras foram submetidas à agitação em vórtex por 1 minuto. Posteriormente foram adicionados 1mL de água e 1 mL de clorofórmio e submetidos a nova

agitação por 2 minutos e então as amostras foram centrifugadas à 1000rpm por 5 minutos, para separação do clorofórmio da fase aquosa. A fase inferior (clorofórmio), aproximante 1,3mL, foi transferida para um tubo de ensaio contendo 1g de sulfato de sódio anidro para remoção dos traços de água. A alíquota de 0,5mL da fase de clorofórmio livre de água foi transferida para um béquer, previamente pesado, e levado a estufa, com circulação forçada de ar, na temperatura de 75°C para evaporação de todo o clorofórmio e nova pesagem do béquer.

O cálculo foi obtido através da diferença das pesagens do béquer, em relação à massa inicial do tecido utilizado.

3.2.2. Determinação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos hepáticos e dos óleos e gordura utilizados na dieta experimental foram determinados por cromatografia gasosa (cromatógrafo SHIMADZU, GC-2014), equipado com auto-injetor AOC-20i, com coluna capilar SGE (BPX-70) de 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme. O gás hélio foi utilizado como carreador, com fluxo de 1,6ml/min. O ar sintético foi utilizado para a ionização em chama com detecção a 280°C. As injeções de 1µl de amostras foram realizadas em modo split. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C. A temperatura inicial da coluna foi de 155°C, elevada a 180°C (2°C por minuto) e novamente elevada a 220°C (4°C por minuto) e mantida nesta por 4 minutos. O tempo total de corrida foi de 26.5 minutos.

O padrão para identificação utilizado foi composto por um mix de ácidos graxos da Supelco (Supelco 37 Component FAME Mix). Os ácidos graxos das

amostras foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção relativos com os tempos de retenção relativos dos ácidos graxos do padrão. A quantificação foi feita por normalização de área e os resultados estão apresentados em porcentagem por peso.

As metodologias utilizadas para a determinação dos ácidos graxos no tecido hepático e nos óleos e gordura utilizados na dieta são descritos a seguir.

3.2.2.1. Determinação de ácidos graxos hepáticos

A determinação da composição de ácidos graxos teciduais foi realizada pelo método de transesterificação direta, adaptado de Lewis et al (2000). Foram utilizados 50mg da amostra de Fígado. Em cada amostra foram adicionados 3 mL de metanol, HCl e Clorofórmio (10/1/1, v/v) para posterior agitação. As amostras foram aquecidas a 90°C em banho-maria, durante 1 hora. Após esse período as amostras foram resfriadas em água e foi adicionado 1mL de água destilada. Posteriormente foram adicionados de 2mL de hexano/clorofórmio (4/1, v/v), em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 3500rpm por 5 minutos. O procedimento foi repetido por mais 2 vezes, para total extração dos ácidos graxos. O sobrenadante obtido, foi seco em fluxo de nitrogênio e a resuspensão foi feita com 150μL de clorofórmio, para seguir a análise no GC.

3.2.2.2. Determinação de ácidos graxos dos óleos e gorduras das dietas experimentais

A determinação dos ácidos graxos do óleo de soja e das gorduras utilizados na dieta foi adaptada de Andreoli et al (2007) através da extração com hexano.

Inicialmente, 50µL de óleo ou gordura foram hidrolisados, em um tubo fechado, com 1,0mL da solução de KOH e Metanol 0,5M a 100°C durante 5 minutos. Posteriormente foram esterificados com a adição de 400 µL da solução de HCl e Metanol (4:1 v/v) e novamente aquecidos a 100°C durante 15 minutos. As amostras foram resfriadas e então, adicionado 2 mL de água para a extração dos ácidos graxos esterificados com o uso do hexano na proporção 2x3mL. A fase orgânica (sobrenadante) obtida foi passada em um funil contendo Na₂SO₄, anidro, para sofrer evaporação, e posteriormente foi redissolvida em 500 µL de CHCl₃, para a análise no GC.

3.2.3. Determinação de colesterol total e triglicérides hepáticos e séricos

As frações lipídicas foram dosadas no fígado após a extração da gordura total pelo método de Bligh e Dyer (1959) e posteriormente determinados por kits comerciais utilizados para análise em soro, conforme descrito a seguir.

3.2.3.1. Determinação do colesterol total

O Colesterol Total foi determinado pelo método de colorimétrico enzimático através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a ácidos graxos e a colesterol livre, que foi então oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e a peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados, na presença da peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando a antipirilquinonimina com absorvidade máxima à 500nm, com intensidade da cor vermelha formada na reação final diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

3.2.3.2. Determinação de triglicerídeos

A determinação dos Triglicerídeos hepáticos foi realizada pela metodologia colorimétrica enzimática através de *kits* comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A hidrólise dos triglicérides foi realizada pela lipase da lipoproteína, liberando o glicerol, que foi convertido em glicerol-3-fosfato, pela gliceroquinase. O glicerol-3-fosfato foi então oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Posteriormente foi realizada uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalizada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorbância máxima em 505nm, sendo que a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra.

3.2.4. Determinação da proteína sérica e hepática

A determinação da proteína sérica e hepática foi realizada através kits comerciais, pelo método de Biureto (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). A determinação da proteína hepática foi realizada no homogenato de fígado, cerca de 50mg de tecido, diluídos em 0,5mL de água, para posterior análise. Os íons cobre em meio alcalino (Reagente de Biureto) reagiram com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, com absorbância máxima em 545nm, sendo proporcional à concentração de proteína da amostra.

3.2.5. Determinação da peroxidação lipídica sérica e hepática

A peroxidação lipídica foi quantificada através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB). Os reagentes utilizados nesta análise foram: solução TCA-TBA-HCl, ou seja, 15% p/v de ácido tricloroacético, 0,375% p/v de ácido tiobarbitúrico em 0,25 N de ácido clorídrico. Para as SRATB livres, cerca de 100mg foi homogeneizada em 1 mL de KCl a 1,15% e foram utilizados 500µL de soro para a determinação pelo método colorimétrico, que consiste na reação dos aldeídos formados, principalmente o malonaldeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico em meio ácido e aquecido à 100°C em banho-maria por 15 minutos. A coloração alaranjada produzida na reação é lida em espectrofotômetro (SpectraMax M5 Molecular Devices) no comprimento de onda de 535nm, de acordo com o proposto por Buege e Aust (1978).

A quantificação das SRATB totais (livres + ligadas a macromoléculas) foi determinada com modificações do protocolo de Cighetti et al (1999). A alíquota de 200µL do homogenato de fígado ou do soro foram utilizados para a determinação do SRATBs totais. Foi adicionado 3 mL de água nanopura e 0,5mL de NaOH 2M para hidrólise dessas substâncias. Após agitação, as amostras foram aquecidas a 60°C por 30 minutos em banho-maria e neutralizados com HCl 2M, e em seguida foi realizada a reação com o ácido tiobarbitúrico, conforme descrito anteriormente (SRATBs livres).

A concentração de SRATB da amostra foi calculada usando uma curva de calibração de malonaldeído (MDA).

3.2.6. Determinação de glutathiona reduzida (GSH) hepática e sérica

A dosagem de glutathiona reduzida (GSH) foi realizada no tecido hepático de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Cerca de 100mg 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 15minutos, 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 é 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 é calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M).

A glutatona reduzida sérica foi dosada por meio de uma alíquota de 25µL de soro com a adição de 1mL do tampão Tris-EDTA para a realização da primeira leitura no comprimento de onda de 412nm, obtendo-se A1. Posteriormente, 25µL 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 et al* (2006).

3.2.7. Determinação de vitamina E hepática e dos óleos e da gordura utilizada na dieta

As análises hepáticas de vitamina E (α -tocoferol) foram realizadas por HPLC, segundo *Arnauld et al* (1991). O HPLC (Shimadzu, modelo LC9A) é caracterizado por: sistema isocrático, detector espectrofotométrico (UV-visível, Shimadzu, modelo SPD-6AV), coluna tipo C18 (Shimpack CLC-ODS 4,6 x 25 cm), pré-coluna 4 mm x 1 cm, e fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min. A concentração foi calculada por meio de um padrão externo da vitamina.

Cerca de 200mg de fígado ou 200µL de soro foram homogeneizados com 100µL mL de etanol absoluto com BHT + 100 µL da solução de padrão interno (acetato de tocoferila) e adicionados de 400µL de n-hexano para extração. Para a

análise no óleo ou gordura foram utilizados 50 μL de lipídeo e 400 μL n-hexano. As amostras sofreram agitação por 2 minutos, para posterior centrifugação (3000rpm durante 15 min). O sobrenadante foi retirado, cerca de 200 μL , e seco ao fluxo de nitrogênio. A ressuspensão do resíduo seco foi realizada com 200 μL da fase móvel Acetonitrila/Diclorometano/Metanol na proporção 70/20/10 e submetido à leitura no comprimento de onda de 292nm.

A curva padrão de alfa-tocoferol foi utilizada para a determinação da concentração na amostra.

3.2.8. Determinação das concentrações séricas das transaminases

aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

As concentrações das transaminases foram avaliadas com o uso de kits comerciais Labtest. O método é descrito por uma transferência de agrupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos, formando, glutamato e oxaloacetato ou o piruvato, que são medidos pela formação de hidrazona, com a característica de cor intensa em meio alcalino.

3.2.9. Cálculos

3.2.9.1. Cálculo do ganho de peso total, ganho de peso e ingestão de dieta e de energia semanal, estimativa de ingestão dos óleos e da gordura animal por semana, estimativa do ganho de peso e consumo de dieta diário, e Cálculo da Taxa de Eficiência da Dieta (TED)

Foram calculados as médias de ganho de peso total e por semana durante o experimento. A média de ganho de peso diário foi estimada pelo ganho de peso semanal. O cálculo da ingestão de dieta semanal e estimativa de ingestão diária foram obtidos pela média de 3 dias de ingestão. A partir da ingestão de dieta semanal, foi estimada a ingestão dos óleos e da gordura animal ofertada nas dietas e da ingestão energética por semana.

A TED expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso e é calculada de acordo com a fórmula apresentada abaixo (Kang, Ahn et al. 2005):

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

3.2.9.2. Cálculo do índice de peroxidabilidade da dieta e dos ácidos graxos hepáticos

O índice de peroxidabilidade (IP) da dieta ou dos ácidos graxos hepáticos foi calculado conforme descreve Pamplona et al (1998) a partir dos dados obtidos na determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos e gordura utilizados na dieta experimental ou no perfil hepático de ácidos graxos, com base no grau de insaturação dos ácidos graxos.

A fórmula utilizada para o cálculo é descrita a seguir:

$$\text{IP} = (\% \text{ monoenóicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienóicos} \times 1) + (\% \text{ trienóicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenóicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenóicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenóico} \times 8).$$

3.2.9.3. Cálculo da estimativa da atividade das enzimas de dessaturação no fígado

O cálculo de índice de dessaturação para estimativa da atividade das enzimas de dessaturação no fígado foi determinado pelo método proposto por Pamplona et al (1998) através da razão entre ácidos graxos.

A estimativa da atividade das enzimas da via de biossíntese do ácido araquidônico, a partir do linoléico, da síntese do palmitoléico a partir do palmítico, da síntese do oléico a partir do ácido esteárico, a síntese do docosahexanóico a partir do α -linolênico, e a do nervônico a partir do lignocérico são expressas pela razão dos ácidos graxos 20:4n-6/18:2n-6, 16:1n-7/16:0, 18:1n-9c/18:0, 22:6n-3/18:3n-3 e 24:1n-9/24:0, respectivamente.

3.2.10. Análise estatística

A comparação entre os grupos experimentais foi realizada pela análise de variância one-way (ANOVA) com pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como nível de significância. O coeficiente de correlação de *Pearson* foi utilizado para quantificar a força de associação linear entre duas variáveis. As variáveis são apresentadas como média $\pm$ desvio padrão (Pagano e Gauvreau, 2004).

Resultados

4. Resultados

4.1. *Composição dos óleos e gordura utilizados no preparo das dietas*

4.1.2 *Perfil de ácidos Graxos dos óleos e da gordura utilizados no preparo das dietas*

A Tabela 2 mostra a composição percentual em ácidos graxos dos óleos de soja, peixe e TCM, e da gordura animal utilizados na preparação das dietas que os animais ingeriram durante todo o experimento.

O óleo de soja apresenta elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e tem o ácido linoléico como principal representante, o que contribui para a elevada razão n-6/n-3, e também para uma baixa razão entre a somatória dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados.

O óleo de peixe apresenta elevado conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados n-3, sendo que os principais representantes são o EPA e DHA, contribuindo para uma baixa razão n-6/n-3 e também para uma baixa razão da somatória dos ácidos graxos saturados/poli-insaturados. No entanto, no óleo de peixe verifica-se um elevado conteúdo do ácido palmítico, o que contribui para um maior percentual de ácidos graxos saturados, semelhante ao encontrado na gordura animal.

O elevado conteúdo de ácido oléico encontrado na gordura animal contribui para um elevado percentual de ácidos graxos monoinsaturados. A elevada razão

entre a somatória dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados pode ser verificada na gordura animal, devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos saturados.

O óleo de TCM é composto principalmente por ácidos graxos saturados de cadeia com 8 e 10 carbonos (Caprílico e Cáprico) e em menor percentual o ácido Mirístico, com 14 carbonos. A análise dos ácidos graxos do óleo de TCM apresentou valores mínimos de ácidos graxos com insaturações e, portanto não foram apresentados na tabela.

Tabela 2. Composição Percentual em Ácidos Graxos dos Óleos de Soja, Peixe, TCM e Gordura Animal utilizados nas dietas experimentais.

Ácido Graxo	Estrutura	Óleos			Gordura Animal
		Soja	Peixe	TCM	
Ácidos Graxos Saturados					
Ácido Caprílico	C8:0	<0,05	<0,05	52,02	<0,05
Ácido Cáprico	C10:0	<0,05	<0,05	35,00	<0,05
Ácido Mirístico	C14:0	<0,05	7,31	12,78	1,40
Ácido Palmítico	C16:0	12,26	22,28	<0,05	24,53
Ácido Esteárico	C18:0	3,35	4,81	<0,05	10,07
Ácido Tricosanóico	C23:0	0,15	0,75	<0,05	<0,05
ΣAGS		15,76	35,15	99,80	36,00
Ácidos Graxos Monoinsaturados					
Ácido Palmitoléico	C16:1	<0,05	7,54	<0,05	2,39
Ácido Oléico	C18:1n9c	23,61	10,36	<0,05	43,23
Ácido Erúico	C22:1n9	0,15	1,42	<0,05	<0,05
ΣAGMI		23,76	19,32	-	45,61
Ácidos Graxos Poli-insaturados					
Ácidos Graxos n-6					
Ácido Linoléico	C18:2n6c	58,96	11,31	<0,05	16,54
Ácido Di-homo-linolênico	C20:3n6	<0,05		<0,05	0,53
Ácido Araquidônico	C20:4n6	<0,05	0,46	<0,05	<0,05
Σn-6		58,96	11,77	-	17,07
Ácidos Graxos n-3					
Ácido α-linolênico	C18:3n3	0,38	1,91	<0,05	<0,05
Ácido Eicosatetraenóico	C20:3n3	<0,05	0,22	<0,05	<0,05
Ácido Eicosapentaenóico	C20:5n3	<0,05	15,05	<0,05	<0,05
Ácido Docosahexaenóico	C22:6n-3	<0,05	12,60	<0,05	<0,05
Σn-3		0,38	29,78	-	<0,05
ΣAGPI		59,49	41,55	-	17,07
Razão n-6/n-3		155,16	0,40	-	-
Razão ΣAGS/ΣAGPI		0,26	0,85	-	2,03
Outros Ácidos Graxos		1,13	4,20	0,20	1,32

Σ : somatória; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; n-3: ácidos graxos ômega-3; n-6: ácidos graxos ômega-6, AGI: ácidos graxos insaturados.

4.1.3. Índice de peroxidabilidade dos óleos e da gordura utilizados no preparo das dietas

A Figura 5 ilustra o Índice de Peroxidabilidade dos óleos de soja, peixe, TCM e da gordura animal utilizados nas dietas experimentais. No óleo de peixe foi observado elevado índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos, seguido do óleo de soja, em ordem decrescente. A gordura animal apresentou um baixo índice de peroxidabilidade. Devido à presença de quantidades mínimas de ácidos graxos com insaturações não foi possível realizar o cálculo do índice de peroxidabilidade do óleo de TCM. Estima-se que o índice de peroxidabilidade do óleo de TCM também seja mínimo devido a sua composição com elevado percentual de ácidos graxos saturados.

Figura 5. Índice de Peroxidabilidade dos óleos de soja, peixe e TCM e da gordura animal utilizados na dieta experimental. Barras largas verticais representam à média. $IP = (\% \text{ monoenóicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienoícos} \times 1) + (\% \text{ trienoícos} \times 2) + (\% \text{ tetraenóicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenóicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenóico} \times 8)$.

4.1.4. Vitamina E dos óleos e da gordura animal utilizados nas dietas

As concentrações da vitamina E presente nos óleos e gorduras utilizados na preparação das dietas consumidas pelos animais são apresentadas abaixo na Figura 6. O óleo de soja é o principal representante devido a elevada concentração da vitamina E, seguido do óleo de peixe, óleo de TCM e da gordura animal, em ordem decrescente de concentração.

A estimativa do conteúdo de vitamina E nas dietas consumidas pelos animais foi realizada pela proporção em grama dos óleos e gordura utilizados. Os valores são apresentados na tabela 3. A dieta do grupo HL⁺TCM apresentou menor estimativa do conteúdo de vitamina E em relação as dietas dos grupos Controle, HL⁺OS e HL⁺OP que continham óleo de soja e óleo de peixe. O conteúdo de vitamina E no grupo HL⁺OP foi maior que o estimado na dieta dos grupos grupo Controle, HL⁺GA e HL⁺TCM, e menor que na dieta do grupo HL⁺OS.

Figura 6. Valores de Vitamina E na gordura animal e nos óleos utilizados nas dietas (nmol/mL). Barras largas verticais representam a média, barras finas representam os desvios-padrões. ^ap<0,001 vs gordura animal, óleo de TCM e óleo de peixe. ^bp<0,001 vs gordura animal. ^cp<0,001 vs gordura animal e óleo de TCM.

Tabela 3. Estimativa do conteúdo de Vitamina E nas dietas consumidas pelos animais (nmol/g dieta).

	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Vitamina E (nmol/g dieta)	19,80±0,26	12,18±0,59	50,97±0,64 ^a	17,05±0,40 ^b	23,05±0,50 ^c

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^bp<0,001 vs Controle e HL⁺GA. ^cp<0,001 vs Controle, HL⁺GA e HL⁺TCM. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.2. *Crescimento dos animais e Ingestão de dieta e energética por semana*

A comparação das médias de peso inicial, final e ganho de peso dos animais não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais. Os dados são apresentados na tabela 4. As médias de peso observadas semanalmente durante o experimento são apresentadas no Apêndice A e também não apresentaram diferença estatística.

. O grupo alimentado com óleo de peixe apresentou um menor ganho de peso na segunda semana do experimento, já na quarta e na sétima semana o ganho foi maior que os grupos controle e os alimentados com as dietas hiperlipídicas. O cálculo de ganho de peso e ingestão energética entre as semanas do experimento é apresentado nas figuras 7, 8, 9, 10 e 11.

Tabela 4. Peso inicial, peso final e ganho de peso dos animais (g).

Peso	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Peso Inicial (g)	72,8 ±10,1	72,9±9,9	76,1±5,8	76±6,3	71±6,5
Peso Final (g)	413±38,0	456,5±43,0	448,3±65,32	407,1±37,7	455,8±49,4
Δ Peso (g)	339,7±40,3	383,6±38,9	372,2±67,2	331,1±40,5	384,8±49,9

Resultados expressos em média ± DP. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Os valores obtidos da ingestão semanal de dieta representam a média de três dias de consumo alimentar e são apresentados no Tabela 5. A adaptação à dieta hiperlipídica foi realizada nas duas primeiras semanas e não foi observada diferença significativa na ingestão da dieta entre os grupos experimentais. A partir da terceira semana, o consumo de dieta do grupo HL⁺OP foi menor que do grupo Controle e a ingestão energética foi menor que o grupo HL⁺GA. A partir da quarta semana até o fim do período experimental a ingestão alimentar dos animais dos grupos que receberam as dietas HL⁺ foi significativamente menor, comparados ao Controle, o que resultou em manutenção da ingestão energética consumida pelos grupos alimentados com as dietas hiperlipídicas. Na última semana do experimento, o grupo HL⁺OP apresentou um aumento do consumo alimentar (em relação ao grupo HL⁺TCM), que resultou em maior ingestão energética, compara aos grupos Controle e HL⁺TCM.

A estimativa de ingestão dos óleos e da gordura animal oferecidos nas dietas dos animais revelou, que na terceira semana, o grupo HL⁺OP apresentou menor consumo de óleo de peixe em relação ao consumo de óleo de TCM pelo grupo HL⁺TCM. Já na última semana, o grupo HL⁺OP apresentou um aumento da ingestão tanto do óleo de peixe quanto da gordura animal em relação aos óleos de soja e de TCM e da gordura animal consumida pelos animais dos grupos HL⁺OS e HL⁺TCM. Os dados são apresentados no Apêndice B.

Tabela 5. Consumo médio semanal de dietas pelos animais (g).

Período	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Semana 1	36,9±5,4	35±5,43	36,4±2,77	33,53±3,66	36,4±7,89
Semana 2	40,1±9,54	39,7±5,06	38,43±5,35	39,5±5,04	35,5±5,66
Semana 3	47,47±4,37	40,17±8,2	38,03±7,21	39,37±4,38	31,57±6,63 ^a
Semana 4	46,97±1,88	33,8±6,39 ^a	34,13±6,23 ^a	33,63±4,33 ^a	34,23±5,99 ^a
Semana 5	51,27±3,9	33,07±8,24 ^a	32,4±4,77 ^a	33,03±8,1 ^a	36,7±3,04 ^a
Semana 6	53,33±5,9	41,57±7,39 ^a	40,43±9,85 ^a	39,63±6,7 ^a	37,13±4,89 ^a
Semana 7	57,6±15,5	41,55±6,13 ^a	40,7±6,40 ^a	38,4±4,40 ^a	49,55±7,20 ^b

Resultados expressos em média ± DP. Os valores expressos para cada grupo por semana representam a média de três dias de consumo. ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,001 vs HL⁺TCM. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Figura 7. Ganho de peso (g) e ingestão energética por semana (Kcal) dos animais do grupo Controle. Os pontos representam valores médios de ganho de peso e ingestão energética por semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. ^a $p < 0,05$ vs HL⁺OP. (■) Ganho de peso (g); (♦) Ingestão Energética (Kcal). O grupo Controle recebeu a dieta padrão AIN-93.

Figura 8. Ganho de peso (g) e ingestão energética por semana (Kcal) dos animais do grupo HL⁺GA. Os pontos representam valores médios de ganho de peso e ingestão energética por semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. ^ap<0,05 vs HL⁺OP. (■) Ganho de peso (g); (◆) Ingestão Energética (Kcal). O grupo HL⁺GA recebeu dieta hiperlipídica com 50% gordura animal.

Figura 9. Ganho de peso (g) e ingestão energética por semana (Kcal) dos animais do grupo HL⁺OS. Os pontos representam valores médios de ganho de peso e ingestão energética por semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. Não houve diferença significativa entre os demais grupos experimentais. (■) Ganho de peso (g); (◆) Ingestão Energética (Kcal). O grupo HL⁺OS recebeu dieta hiperlipídica com 35% gordura animal e 15% de óleo de soja.

Figura 10. Ganho de peso (g) e ingestão energética por semana (Kcal) dos animais do grupo HL⁺TCM. Os pontos representam valores médios de ganho de peso e ingestão energética por semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. ^a $p < 0,05$ vs HL⁺OP. (■) Ganho de peso (g); (♦) Ingestão Energética (Kcal). O grupo HL⁺TCM recebeu dieta hiperlipídica com 35% gordura animal e 15% de óleo de TCM.

Figura 11. Ganho de peso (g) e ingestão energética por semana (Kcal) dos animais do grupo HL⁺OP. Os pontos representam valores médios de ganho de peso e ingestão energética por semana, as barras verticais em cada ponto expressam os desvios-padrões. ^ap<0,05 vs HL⁺GA. ^bp<0,05 vs Controle e HL⁺TCM. ^cp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS, HL⁺TCM. (■) Ganho de peso (g); (♦) Ingestão Energética (Kcal). O grupo HL⁺OP recebeu dieta hiperlipídica com 35% gordura animal e 15% de óleo de peixe.

4.3. Ganho de peso, ingestão alimentar e energética diários e taxa de eficiência da dieta

O ganho de peso diário dos animais não apresentou diferença significativa entre os dos grupos experimentais. Apesar dos grupos alimentados com a dieta hiperlipídica apresentarem uma redução do consumo dietético quando comparados ao grupo controle, pode-se verificar uma manutenção da ingestão energética, devido ao maior percentual de energia da dieta hiperlipídica (74%), em relação à dieta controle (16%).

A taxa de eficiência da dieta consiste na razão entre o ganho de peso e o consumo de dieta diários, e expressa a eficiência da dieta em propiciar o ganho de peso. As dietas hiperlipídicas compostas pela gordura animal somente, e as compostas por gordura animal adicionadas de óleo de soja ou de óleo de peixe apresentaram maior taxa de eficiência no ganho de peso quando comparadas a dieta padrão do grupo controle. No grupo HL+TCM, a eficiência da dieta em propiciar o ganho de peso foi semelhante ao grupo Controle e a comparação entre os animais alimentados com as dietas hiperlipídicas revelou menor TED em relação ao grupo alimentado com óleo de peixe. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Ingestão Alimentar Diária (g/dia), Ingestão Energética Diária (Kcal/dia), Ganho de Peso Diário (g/dia) e Taxa de Eficiência da Dieta.

	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Ingestão Dieta (g/dia)	19,69±1,33	15,88±1,94 ^a	15,68±2,17 ^a	15,5±1,6 ^a	15,28±1,52 ^a
Ingestão Energética (Kcal/dia)	188,27±28,73	230,81±22,78	227,02±18,96	224,04±19,19	227,51±34,93
Ganho de Peso (g/dia)	8,10±0,91	9,13±0,93	8,86±1,61	7,88±0,96	9,16±1,19
Taxa Eficiência da Dieta	0,41±0,06	0,58±0,03 ^a	0,56±0,04 ^a	0,51±0,0 ^b	0,60±0,03 ^a

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,01 vs HL⁺OP. A ingestão de dieta representa a média de ingestão diária para cada grupo; o ganho de peso é a média do ganho diário de peso dos animais de um mesmo grupo; Taxa de eficiência da dieta (TED) = [ganho de peso (g)/consumo de dieta (g)]; a TED expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.4. *Peso hepático e acúmulo de gordura hepática*

Os fígados foram pesados no dia da eutanásia dos animais. Os resultados obtidos, como a peso hepático, a razão entre o peso hepático e o peso corporal dos animais e a gordura total são apresentados na Tabela 7. O percentual de gordura hepática em relação ao peso hepático é apresentado na Figura 12. Observa-se que os animais dos grupos que receberam as dietas somente com a gordura animal e as dietas com gordura animal adicionadas de óleo de soja ou de óleo de peixe apresentaram peso hepático significativamente maior em relação ao controle. A razão entre o peso hepático e o peso corporal revela um aumento nos grupos HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP em relação ao Controle. Entre os animais que receberam as dietas hiperlipídicas, verifica-se um aumento do peso hepático no grupo HL⁺OP em relação ao HL⁺TCM, no entanto, a correção pelo peso corporal, mostra o aumento da razão peso hepático/peso corporal em relação ao grupo que recebeu somente a gordura animal.

O acúmulo de gordura hepática total apresentou-se maior nos grupos que receberam as dietas hiperlipídicas em relação ao grupo controle. A mesma tendência se observa para o percentual de gordura hepática em relação ao peso tecidual, em que os grupos HL⁺ apresentaram um aumento em relação ao controle.

Tabela 7. Valores médios de peso hepático (g) e da razão entre o peso hepático e peso corporal e quantidades médias de gordura hepática (mg/g Tecido).

	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Peso hepático (g)	13,37±1,63	17,64±2,54 ^a	18,52±3,97 ^a	16,59±2,56	21,06±2,41 ^b
Razão Peso hepático/Corporal	3,25±0,4	3,85±0,28	4,10±0,42 ^a	4,11±0,82 ^a	4,63±0,32 ^c
Gordura Hepática Total (mg/g Tecido)	50±15	110±35 ^a	120±33 ^a	150±26 ^a	140±46 ^a

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,01 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle e HL⁺TCM. ^cp<0,01 vs Controle e HL⁺GA. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Figura 12. Percentual de Gordura Hepática (%). Barras largas verticais representam a média, barras finas representam os desvios-padrões. ^ap<0,001 vs Controle. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.5. *Colesterol e Triglicerídeos séricos e hepáticos*

Os dados sobre o colesterol total e triglicerídeos séricos e hepáticos são apresentados na Tabela 8 e nas figuras 13 e 14. Os grupos que receberam a dieta hiperlipídica com gordura animal somente e com gordura animal + óleo de TCM apresentaram um aumento significativo do colesterol total hepático em relação ao Controle. Já em relação aos triglicerídeos hepáticos pode-se observar um aumento significativo em todos os grupos que receberam a dieta hiperlipídica, comparados ao Controle. Entre os grupos HL⁺, o grupo HL⁺TCM apresentou um aumento exacerbado dos triglicerídeos hepáticos comparado aos grupos HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. O aumento significativo dos triglicérides hepáticos também foi observado no grupo HL⁺OS em relação aos grupos dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica com gordura animal somente e a dieta hiperlipídica com gordura animal + óleo de peixe. Não foi observada diferença estatística dos valores de triglicerídeos hepáticos entre os grupos HL⁺OP e HL⁺GA.

No soro, somente foi observada diferença estatística no colesterol total sérico devido a uma redução dos valores nos grupos HL⁺TCM e HL⁺OP em relação ao Controle. Os valores de triglicerídeos séricos não apresentaram diferença significativa.

Figura 13. Valores médios de Colesterol total hepático (mg/g Tecido).

Barras largas verticais representam a média, barras finas representam os desvios-padrões. ^ap<0,05 vs Controle. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Figura 14. Valores médios de Triglicerídeos hepático (mg/g Tecido).

Barras largas verticais representam a média, barras finas representam os desvios-padrões ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle, p<0,01 vs HL⁺OP e p<0,05 vs HL⁺GA. ^cp<0,001 vs Controle, HL+GA e HL⁺OP e p<0,05 vs HL+OS. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 8. Valores médios de colesterol total e triglicerídeos séricos (mg/dl).

	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Soro					
Colesterol Total (mg/dL)	77,89±17,6	70,06±9,77	67,7±10,74	60,62±12,72 ^a	59,71±12,8 ^a
Triglicerídeos (mg/dL)	87,76±27,38	93,79±63,86	84,14±28,89	90,69±26,21	66,90±14,41

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,05 vs Controle. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.6. Perfil dos ácidos graxos hepáticos e índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos

A análise do perfil de ácidos graxos hepáticos permite avaliar a quantidade em porcentagem por área dos ácidos graxos totais, sem distinção dos ácidos graxos livres e dos ligados a membrana ou estocados na forma de triacilglicerol. O perfil dos ácidos graxos hepáticos é apresentado nas Tabelas 9 a 14.

A incorporação hepática dos triglicerídeos de cadeia média é mínima. No entanto pode-se observar que o grupo HL⁺TCM apresentou maior incorporação hepática do ácido caprílico e ácido láurico, comparado aos grupos Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. A maior incorporação destes ácidos graxos contribuiu para a maior somatória dos ácidos graxos saturados de cadeia média (AGSCMs) encontrada no grupo HL⁺TCM. A composição hepática dos ácidos graxos saturados de cadeia média nos grupos experimentais é apresentada na Tabela 9.

Os resultados sobre os ácidos graxos saturados de cadeia longa são apresentados na Tabela 10. Apesar do baixo valor percentual hepático, foi encontrado maior valor do ácido mirístico no grupo HL⁺TCM. O ácido palmítico e ácido esteárico são os ácidos graxos que mais contribuem para a composição hepática dos ácidos graxos saturados de cadeia longa nos grupos experimentais. O ácido palmítico hepático apresentou um aumento significativo no grupo HL⁺OP e os maiores valores do ácido esteárico foram encontrados nos grupos HL⁺GA e HL⁺OP, comparados ao Controle. Apesar destas alterações, não foi observada diferença significativa na somatória dos ácidos graxos saturados de cadeia longa e na somatória total dos ácidos graxos saturados.

O principal representante dos ácidos graxos monoinsaturados é o ácido oléico, presente em maiores percentuais nos grupos HL⁺TCM e HL⁺GA, em ordem decrescente. O percentual hepático do ácido palmitoléico nos grupos que receberam a dieta HL⁺ foi menor que o Controle, sendo que, entre os grupos HL⁺, o grupo HL⁺TCM apresentou maior percentual comparado ao grupo HL⁺OS. Desta forma, o grupo HL⁺TCM apresentou o maior percentual da somatória dos ácidos graxos monoinsaturados hepáticos, seguido do grupo HL⁺GA. O perfil hepático de ácidos graxos monoinsaturados é apresentado na Tabela 11.

A composição dos ácidos graxos poli-insaturados é apresentada nas Tabelas 12 e 13. A redução significativa da somatória dos ácidos graxos poli-insaturados n-6, é observada nos grupos HL⁺TCM e HL⁺OP, em relação aos grupos Controle, HL⁺GA e HL⁺OS. Os principais representantes da composição hepática de AGPIs n-6 são os ácidos linoléico e araquidônico. O ácido linoléico encontra-se reduzido nos grupos, HL⁺GA, HL⁺TCM e HL⁺OP em relação ao Controle e ao grupo HL⁺OS. No entanto, o percentual hepático do ácido araquidônico não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais.

A maior somatória dos AGPIs n-3 foi encontrada no grupo HL⁺OP, em relação aos grupos Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. O aumento do percentual hepático dos ácidos graxos hepáticos EPA e DHA observados no grupo HL⁺OP contribuíram significativamente para o aumento da composição hepática de ácidos graxos n-3. O baixo percentual do ácido α -linolênico presente no óleo de peixe contribuiu para a menor incorporação hepática deste ácido graxo no grupo HL⁺OP. Os animais alimentados com a gordura animal + óleo de TCM e somente gordura animal apresentaram menor percentual hepático da somatória dos AGPI n-3, comparados

ao controle, provavelmente devido à redução significativa do percentual hepático dos ácidos α -linolênico e docosahexaenóico nestes grupos experimentais.

Os valores da razão n-6/n-3 são apresentados na Tabela 14. A dieta hiperlipídica contribuiu para o aumento da razão n-6/n-3 dos ácidos graxos hepáticos nos grupos HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM, em relação ao Controle. O óleo de peixe utilizado na dieta hiperlipídica contribuiu para a redução significativa da razão n-6/n-3 dos ácidos graxos hepáticos, em relação ao grupo controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM.

O menor conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3 no grupo HL⁺TCM contribuiu para a menor somatória de ácidos graxos poli-insaturados e, consequentemente, para a maior razão $\Sigma\text{AGS}/\Sigma\text{AGPI}$ hepática. O grupo HL⁺TCM apresentou menor índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos em relação aos grupos Controle e HL⁺OP. Os dados são apresentados na Tabela 14.

A maior concentração de ácidos graxos n-3 pentaenóicos e hexanóicos, como o EPA e DHA no grupo HL⁺OP, contribuíram para a maior suscetibilidade à peroxidação lipídica, estimada pelo índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos, em relação aos grupos Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. Os dados também são apresentados na Tabela 14.

Tabela 9. Porcentagem média de ácidos graxos saturados de cadeia média hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Caprílico	C8:0	0,08±0,02	0,06±0,01	0,02±0,006 ^a	0,16±0,09 ^b	0,03±0,005
Láurico	C12:0	0,02±0,006	0,017±0,004	0,017±0,004	0,08±0,02 ^b	0,015±0,003
Σ AGSCM		0,07±0,04	0,05±0,03	0,03±0,02	0,16±0,09 ^b	0,03±0,02

Resultados expressos em média ± DP. ^a p<0,05 vs Controle. ^b p<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. Σ: somatória; AGSCM: ácidos graxos saturados de cadeia média. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 10. Porcentagem média de ácidos graxos saturados de cadeia longa hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Mirístico	C14:0	0,61±0,08	0,45±0,07 ^a	0,39±0,05 ^a	0,76±0,08 ^b	0,42±0,05 ^a
Palmítico	C16:0	19,80±4,60	21,88±0,48	20,36±0,80	21,81±0,59	22,90±1,68 ^a
Esteárico	C18:0	9,83±2,92	12,46±1,22 ^a	11,27±1,65	11,58±0,79	13,20±0,52 ^a
Σ AGSCL		31,34±12,33	36,32±1,06	33,42±1,17	35,68±0,59	30,83±6,25
Σ AGS		31,48±12,32	36,37±1,07	33,45±1,16	35,84±0,62	30,98±6,16

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle. ^ap<0,05 vs Controle. ^ap<0,01 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. Σ: somatória; AGSCL: ácidos graxos saturados de cadeia longa. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 11. Porcentagem média de ácidos graxos monoinsaturados hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Palmitoléico	C16:1	2,35±0,86	0,55±0,08 ^a	0,38±0,05 ^a	1,02±0,07 ^b	0,67±0,19 ^a
Oléico	C18:1n9c	19,03±5,35	23,76±1,78 ^b	17,81±1,55	28,93±1,32 ^c	16,27±1,05
Σ AGMI		20,58±6,95	25,19±1,76 ^d	18,47±1,60	30,62±1,36 ^c	17,37±1,26

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle e p<0,01 vs HL⁺OS. ^cp<0,01 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. ^dp<0,05 vs Controle e p<0,01 vs HL⁺OS e HL⁺OP. Σ: somatória; AGMI: ácidos graxos mono-insaturados. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 12. Porcentagem média de ácidos graxos poli-insaturados n-6 hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Linoléico	C18:2n6c	28,72±5,31	20,78±0,88 ^a	30,71±1,87	19,08±0,80 ^a	17,78±0,99 ^a
Araquidônico	C20:4n6	11,93±7,70	12,92±1,38	11,27±1,65	8,88±2,92	10,47±2,24
Σ API n-6		41,35±13,26	34,87±1,07	42,9±0,82	29,32±2,94 ^b	28,56±2,59 ^b

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle e HL⁺OS. ^bp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS. Σ: somatória; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; n-6: ácidos graxos ômega-6. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 13. Porcentagem média de ácidos graxos poli-insaturados n-3 hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
α-Linolênico	C18:3n3	1,32±0,36	0,38±0,05 ^a	1,29±0,17	0,37±0,03 ^a	0,46±0,06 ^a
Eicosapentaenóico	C20:5n3	0,83±0,34	0,32±0,08	0,71±0,08	0,13±0,03 ^b	6,65±1,1 ^e
Docosahexaenóico	C22:6n-3	3,91±1,18	2,17±0,27 ^b	2,73±0,54	1,8±0,24 ^b	16,16±2,21 ^e
Σ API n-3		6,74±2,22	3,57±0,37 ^b	5,18±0,40	3,2±0,33 ^a	23,09±4,09 ^e

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle e HL⁺OS. ^bp<0,05 vs Controle. ^cp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. Σ: somatória; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; n-3: ácidos graxos ômega-3. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Tabela 14. Razão entre ácidos graxos da via ômega-6 e da via ômega-3, razão entre a somatória do percentual de ácidos graxos saturados e poli-insaturados e índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos.

Ácidos Graxos Poli-insaturados	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Razão n-6/n-3	6,41±2,29	9,96±0,98 ^a	8,71±0,65 ^a	9,22±0,61 ^a	1,29±0,27 ^b
Razão Σ AGS/AGPI	0,77±0,54	0,95±0,04	0,70±0,03	1,11±0,14 ^c	0,62±0,20
Índice Peroxibilidade	118,41±32,94	95,87±7,11	107,96±8,91	85,01±22,05 ^a	223,72±36,10 ^a

Resultados expressos em média $\pm$ DP. ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. ^cp<0,05 vs Controle e HL⁺OS e p<0,01 vs HL+OP. Σ : somatória; AGSCM: ácidos graxos saturados de cadeia média, AGSCL: ácidos graxos saturados de cadeia longa., AGS: ácidos graxos saturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados, n-3: ácidos graxos Ômega-3, n-6: ácidos graxos Ômega-6, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.7. *Correlação linear entre o índice de peroxidabilidade e a razão entre a somatória dos ácidos graxos saturados e poli-insaturados hepáticos*

A Figura 15 apresenta a correlação linear entre o índice de peroxidabilidade e a razão entre a somatória de ácidos graxos saturados e a somatória dos ácidos graxos poli-insaturados hepáticos. A menor relação $\Sigma\text{AGS}/\Sigma\text{AGPI}$ evidencia um maior índice de peroxidabilidade devido à maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados.

Figura 15. Correlação Linear entre o Índice de peroxidabilidade e a razão entre a somatória de ácidos graxos saturados e ácidos graxos poli-insaturados hepáticos. $r = -0,57$ ($p < 0,0001$).

4.8. Estimativa da atividade das enzimas de dessaturação hepáticas

A estimativa da atividade das enzimas de dessaturação no fígado foi determinada pela razão entre os ácidos graxos. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

A estimativa do coeficiente de atividade das enzimas que participam da via de biossíntese do ácido araquidônico a partir do linoléico encontra-se diminuída no grupo dos animais alimentados com gordura animal + óleo de soja, comparado aos grupos Controle, HL⁺GA e HL⁺OP.

O aumento na razão DHA/ α -linolênico no grupo HL⁺OP, comparado ao controle e HL⁺OS, é resultante da ingestão do óleo de peixe rico em DHA, e não propriamente do aumento da atividade das enzimas dessaturases hepáticas.

Nos grupos alimentados com a dieta hiperlipídica, verifica-se uma redução na conversão do ácido palmítico a palmitoléico, em relação ao Controle. No entanto, verifica-se um aumento da razão palmitoléico/palmítico no grupo HL⁺TCM, em relação aos grupos HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP.

A síntese do ácido oléico a partir do esteárico, verificada pela razão entre os ácidos graxos hepáticos oléico e esteárico, encontra-se aumentada nos grupos HL⁺GA e HL⁺TCM em relação ao Controle e aos demais grupos alimentados com a dieta hiperlipídica, enquanto o grupo HL⁺OS apresenta uma redução em relação ao Controle.

Tabela 15. Estimativa da atividade das enzimas de dessaturação verificadas pelas razões entre ácidos graxos hepáticos.

Índice de Dessaturação Enzimas	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
ARA/Linoléico (C20:4 n-6/C18:2n-6)	0,61±0,19	0,61±0,08	0,37±0,07 ^a	0,508±0,057	0,58±0,12
DHA/α-linolênico (C22:6 n-3/C18:3n-3)	3,37±1,91	5,72±1,26	2,19±0,65	4,87±0,80	33,10±6,25 ^b
Palmitoléico/Palmítico (C16:1n-7/C16:0)	0,08±0,019	0,026±0,003 ^c	0,019±0,002 ^c	0,047±0,003 ^a	0,029±0,008 ^c
Oleico/Estearico (C18:1n-9/C18:0)	0,015±0,007	0,03±0,006 ^d	0,007±0,001 ^c	0,054±0,008 ^e	0,013±0,002

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,01 vs Controle, HL⁺GA e HL⁺OP. ^bp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. ^cp<0,001 vs Controle. ^dp<0,001 vs Controle, HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^ep<0,001 vs Controle, HL⁺OS e HL⁺OP. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.9. Peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada pela quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) no soro e no fígado. Os resultados são apresentados na Tabela 16.

O grupo alimentado com a dieta composta por gordura animal + óleo de peixe apresentou um aumento das SRATBs totais, em relação ao grupo HL⁺TCM e das SRATBs livres, em relação ao Controle e ao grupo HL⁺TCM, no fígado. Apesar de uma redução nos valores de SRATBs totais hepáticas no grupo HL⁺TCM, não apresentou diferença estatística em comparação ao controle. Em relação às quantidades séricas, foi encontrada diferença estatística apenas nos animais alimentados somente com a gordura animal, que apresentaram redução das SRATBs livres em relação ao controle.

Tabela 16. Médias de valores de peroxidação lipídica sérica e hepática observada através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico livres e totais (nmol/g Proteína).

SRATB Hepáticas e Séricas (nmol/g de Proteína)	Controle	HL⁺ GA	HL⁺ OS	HL⁺ TCM	HL⁺ OP
SRATB Totais Hepáticas	112,45±21,85	121,34±11,45	127,19±18,89	88,19±21,64	143,64±76,75 ^a
SRATB Livres Hepáticas	6,69±1,46	11,94±6,89	10,44±5,38	7,29±1,87	20,96±8,49 ^b
SRATB Totais Séricas	78,16±40,93	57,45±11,42	70,31±15,53	64,6±13,24	76,58±17,1
SRATB Livres Séricas	40,56±8,74	30,21±5,38 ^c	32,89±3,85	33,92±9,28	38,2±9,92

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,05 vs HL⁺TCM. ^bp<0,01 vs Controle e HL⁺TCM. ^cp=0,03 vs Controle. SRATB: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.10. Componentes do sistema antioxidante

Os valores da GSH sérica e hepática e da vitamina E hepática são apresentados na Tabela 17. Verifica-se uma preservação significativa da GSH hepática no grupo HL⁺TCM, comparado aos grupos HL⁺GA e HL⁺OP. No entanto, a análise da GSH no soro, revelou valores significativamente mais elevados no grupo HL⁺OP, comparado aos grupos Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. A vitamina E hepática apresenta maiores valores no grupo HL⁺TCM, em relação aos grupos Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. Valores significativamente reduzidos de vitamina E são encontrados no grupo HL⁺OP e HL⁺GA, comparados ao Controle. Os resultados apresentam a mesma tendência quando o cálculo da vitamina E é realizado tanto em relação à quantidade de tecido quanto de gordura hepática, com exceção do grupo HL⁺OS, em que a análise da vitamina E hepática por grama de gordura revela uma redução significativa em relação ao controle.

Tabela 17. Valores médios de glutathiona reduzida sérica e hepática (nmol/g Proteína) e vitamina E hepática (nmol/g Tecido e nmol/g Gordura) como indicadores do sistema antioxidante.

Antioxidantes Hepáticos e Séricos	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
GSH Hepático (nmol/g Proteína)	0,60±0,24	0,44±0,29	0,59±0,24	0,85±0,31 ^a	0,40±0,19
GSH Sérico (nmol/mL)	29±12,78	23±7,93	30±11,93	29±9,47	60,27±17,38 ^b
Vitamina E Hepática (nmol/g Tecido)	22,59±6,67	8,99±1,11 ^c	13,88±2,62	102,17±20,44 ^d	5,82±2,7 ^c
Vitamina E Hepática (nmol/g Gordura)	0,47±0,13	0,08±0,02 ^c	0,12±0,05 ^c	0,72±0,23 ^d	0,04±0,02 ^c

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,01 vs HL⁺GA e HL⁺OP. ^bp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. ^cp<0,05 vs Controle. ^dp<0,05 vs Controle e p<0,001 vs HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. GSH – glutathiona reduzida. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

4.11. Transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

O dano hepático foi avaliado pela quantificação das transaminases no soro. Os grupos que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram maiores valores de ALT, quando comparados ao grupo Controle. Os dados são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentrações médias séricas de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase apresentadas pelos grupos.

Transaminases Séricas	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
AST (U/L)	24,61±0,99	25,84±1,32	25,3±1,66	25,05±1,26	25,48±1,3
ALT (U/L)	24,10±1,59	30,13±2,40 ^a	27,40±2,32 ^a	27,55±1,30 ^a	28,27±2,68 ^a

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Discussão

5. Discussão

No presente estudo foram utilizados lipídeos de diferentes composições em ácidos graxos e para comprovação de que apresentavam a composição esperada foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos dos óleos e gorduras utilizados nas dietas consumidas pelos animais.

A composição de ácidos graxos do óleo de peixe apresentou-se conforme o esperado (Otto, Tsai et al. 1991; Lopez, Moller et al. 2008). A análise do perfil de ácidos graxos revelou um elevado percentual da somatória de ácidos graxos poli-insaturados n-3, composto principalmente pelo EPA e DHA, o que contribuiu para a baixa razão n-6/n-3. A somatória dos ácidos graxos monoinsaturados no óleo de peixe apresentou valores percentuais próximos ao encontrado no óleo de soja. No entanto, no óleo de peixe, os ácidos graxos monoinsaturados são representados por quantidades consideráveis tanto do ácido palmitoléico como do ácido oléico. Verificou-se um elevado percentual de ácidos graxos saturados no óleo de peixe, sendo que o ácido palmítico é o principal representante com valor percentual semelhante ao encontrado na gordura animal. O óleo de peixe não refinado, utilizado nos estudos em geral, apresenta elevado percentual de ácidos graxos saturados e colesterol (Ventura, Woollett et al. 1989). O uso de peixes com alto percentual de gordura corporal para a extração do óleo contribui para o aumento destes percentuais (Pickova 2009).

O valor de colesterol encontrado em peixes marinhos como a sardinha é de 142mg/100g, de 68,2mg/100g para o atum e de 87mg/100g para o salmão, cozidos

em calor seco (TACO 2006; USDA 2009). Os dados sobre o conteúdo de colesterol no óleo de peixe são escassos na literatura, no entanto, espera-se que o valor do colesterol no óleo seja maior que o encontrado na matéria-prima, devido à extração da fração lipídica.

O índice de peroxidabilidade observado no óleo de peixe é extremamente elevado e resulta do elevado percentual dos ácidos graxos eicosapentaenóico e docosahexaenóico.

Os principais representantes dos ácidos graxos saturados de cadeia média no óleo de TCM são o ácido cáprico e ácido caprílico. Em menor percentual, foi encontrado o ácido mirístico, considerado um ácido graxo de cadeia longa. O óleo de TCM é composto prioritariamente por ácidos graxos saturados de cadeia média e, portanto, apresenta percentuais mínimos de ácidos graxos essenciais n-6 e n-3 (Floyd 1999). Os resultados observados na composição em ácidos graxos do óleo de TCM utilizado na dieta dos animais também se apresentam conforme o esperado (Wollin, Wang et al. 2004). Estima-se que o índice de peroxidabilidade do óleo de TCM seja mínimo, pois é constituído principalmente por ácidos graxos saturados e apresenta valores mínimos de ácidos graxos com insaturações.

A gordura animal e o óleo de soja também apresentaram a composição de ácidos graxos conforme os resultados encontrados na literatura (Feoli, Roehrig et al. 2003; Sealls, Gonzalez et al. 2008).

Na gordura animal foi encontrado um elevado percentual de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, representados pelo ácido palmítico e ácido oléico, respectivamente, pois estão presentes em elevado percentual. O ácido linoléico é o principal representante dos ácidos graxos n-6 presentes na gordura animal. O percentual de AGPI n-3 encontrado na gordura animal foi mínimo e, portanto,

estima-se que a razão n6/n-3 seja elevada. A razão entre a somatória de ácidos graxos saturados e poli-insaturados é bastante elevada na gordura animal devido ao elevado percentual de ácidos graxos saturados e ao relativamente menor percentual da somatória de ácidos graxos poli-insaturados, o que contribui para o baixo índice de peroxidabilidade encontrado.

O óleo de soja apresentou elevado percentual da somatória de ácidos graxos poli-insaturados cuja principal fonte também é o ácido linoléico, e juntamente com o baixo percentual do ácido α -linolênico, contribuem para a elevada razão n-6/n-3 encontrada. Devido ao elevado percentual de ácidos graxos poli-insaturados, o índice de peroxidabilidade do óleo de soja é alto, no entanto, menor que o encontrado no óleo de peixe.

Os animais alimentados com as dietas hiperlipídicas apresentaram uma redução da ingestão alimentar comparados ao Controle, a partir da terceira semana do experimento no grupo HL⁺OP e da quarta semana para os grupos HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. A redução da ingestão alimentar foi associada ao aumento da quantidade de lipídeos na dieta (35% na terceira semana e 50% na quarta semana) resultando no aumento da densidade energética. A redução da ingestão de dieta observada nos grupos HL⁺ resultou em manutenção da ingestão energética. A baixa palatabilidade do óleo de peixe provavelmente influenciou a redução da ingestão alimentar do grupo HL⁺OP na terceira semana do experimento, levando a uma menor ingestão de energia. Os dados referentes à ingestão alimentar dos animais são concordantes com o encontrado em outros estudos e demonstram uma adaptação à dieta hiperlipídica que resulta na redução do consumo de dieta e manutenção da ingestão energética diária (Sinitskaya, Gourmelen et al. 2007; Larter

and Yeh 2008; Caton, Yinglong et al. 2009). A redução da ingestão alimentar associada ao uso do óleo de peixe na dieta também foi encontrada por Buettner et al (2006).

O peso corporal dos animais não apresentou diferença estatística entre os grupos durante todo o experimento (peso inicial, final e evolução semanal). A ausência de maior ganho de peso também é observada em outros estudos que utilizam o modelo experimental da dieta hiperlipídica para indução de esteatose hepática (Lieber, Leo et al. 2004; Sinitskaya, Gourmelen et al. 2007; Caton, Yinglong et al. 2009). A adaptação à dieta hiperlipídica resulta na manutenção da ingestão energética diária dos animais e estes podem não desenvolverem o aumento de peso e obesidade (Larter and Yeh 2008).

Apesar do peso dos animais que receberam as dietas hiperlipídicas não terem aumentado em relação ao Controle, o cálculo do ganho de peso por semana revelou um maior ganho de peso no grupo HL⁺OP na quarta e na última semana do experimento. O maior ganho de peso foi associado, à regularização da ingestão alimentar, que havia sido diminuída na terceira semana, e ao aumento da ingestão alimentar e energética na última semana.

As dietas HL⁺ consumidas pelos grupos HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP, apresentaram maior taxa de eficiência em propiciar o ganho de peso (TED) devido à maior densidade energética, em relação ao controle. No entanto, a dieta consumida pelo grupo HL⁺TCM, apresentou menor TED comparado ao grupo HL⁺OP. Os triglicerídeos de cadeia média podem ser associados a um menor efeito no ganho de peso devido ao menor ganho de gordura corporal resultantes da β -oxidação preferencial e do estímulo à oxidação e redução da síntese de triglicerídeos no tecido adiposo (Han, Hamilton et al. 2003; Hariri and Thibault 2010). A oxidação dos

triglicerídeos de cadeia média resulta em menor liberação de energia (8.3Kcal/g) que os triglicérides de cadeia longa (Lavau and Hashim 1978), o que também pode ter contribuído para a menor eficiência em propiciar o ganho de peso.

A associação entre o aumento do peso hepático e/ou razão peso hepático/peso corporal e o aumento da gordura hepática total e do valor percentual em relação ao peso hepático pode ser observada em todos os grupos experimentais que receberam as dietas HL⁺ em relação ao controle. O maior acúmulo de gordura hepática foi associado ao aumento significativo dos triglicérides hepático em todos os grupos que receberam as dietas HL⁺ em relação ao controle.

Segundo alguns estudos a esteatose hepática é definida por um acúmulo de gordura maior que 5 a 10% em relação ao peso tecidual (Varela-Rey, Embade et al. 2009; Vanni, Bugianesi et al. 2010). Os valores percentuais de gordura hepática obtidos nos grupos HL⁺ são entre 11 e 15%, conforme apresentado na Figura 12 e portanto, permitem observar a eficiência da dieta hiperlipídica, composta por 50% de lipídeos, em promover a esteatose hepática. Apesar da histologia hepática ser o método considerado padrão ouro no diagnóstico de esteatose, o estudo de Hijona et al (2010) verificou boa correlação da quantificação bioquímica de gordura hepática com a classificação histológica da esteatose hepática proposta por Kleiner & Brunt.

O uso da gordura animal, rica em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e AGPIs n-6, na dieta hiperlipídica está associado à indução da esteatose hepática, aumento do colesterol total e triglicerídeos hepáticos. O aumento do peso hepático e a indução da esteatose também foram observados em um estudo com ratos *Wistar* alimentados com a dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados e monoinsaturados provenientes da gordura animal (Buettner, Parhofer et al. 2006). A

indução da esteatose hepática, aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides hepáticos foram observados em ratos *Sprague-Dawley* que consumiram a dieta hiperlipídica com 58% do valor calórico, em maior parte proveniente de ácidos graxos saturados e ácidos graxos poli-insaturados n-6 (Svegliati-Baroni, Candelaresi et al. 2006).

O presente estudo revelou diferenças no acúmulo das frações lipídicas hepáticas associadas a diferentes fontes de lipídeos da dieta.

O óleo de TCM utilizado na dieta do grupo HL⁺TCM contribuiu para um acúmulo exacerbado de triglicérides hepático, significativamente maior que o encontrado nos outros grupos que receberam dietas hiperlipídicas. As dietas que utilizaram em maior proporção ácidos graxos saturados (grupos HL⁺GA e HL⁺TCM) foram associadas ao acúmulo significativamente maior do colesterol total hepático em relação ao controle.

A associação entre o uso dos TCMs na dieta hiperlipídica, aumento do peso hepático e o acúmulo de lipídeos hepáticos na forma de triglicerídeos é observada em alguns estudos (Geelen, Schoots et al. 1995; Wein, Wolfram et al. 2009). A redução da esteatose hepática somente foi observada com a substituição total dos lipídeos pelos triglicerídeos de cadeia média na dieta hiperlipídica (Han, Hamilton et al. 2003; Lieber, DeCarli et al. 2008), portanto, o aumento do acúmulo de triglicerídeos hepáticos pode resultar da associação de TCL e TCM na dieta (Lieber, DeCarli et al. 2008).

O aumento significativo do acúmulo de gordura hepática na forma de triglicerídeos associado ao uso dos TCMs pode ser resultante da característica de rápida absorção, pois são absorvidos diretamente para o fígado pela veia porta ligados a albumina, sem a necessidade de transportadores como fator limitante

(Geelen, Schoots et al. 1995). Além disso, os TCMs não dependem do transporte mitocondrial realizado pela carnitina palmitoil transferase-1, resultando em extensiva oxidação mitocondrial e elevada produção que Acetil CoA cuja uma parte é destinada como substrato para a síntese de ácidos graxos, através da *síntese de novo* de ácidos graxos (Bach and Babayan 1982; Geelen, Schoots et al. 1995).

Estudos demonstram a associação entre o uso dos TCMs e uma menor inibição das enzimas lipogênicas resultando num aumento tanto na síntese quanto na esterificação dos ácidos graxos, favorecendo o acúmulo hepático (Chanez, Bois-Joyeux et al. 1991; Foufelle, Perdereau et al. 1992). O aumento da lipogênese hepática foi demonstrado em animais alimentados com TCM (Crozier 1988). Outro estudo demonstrou o aumento da atividade da SREBP-1 favorecendo a ação das enzimas lipogênicas hepáticas no grupo de animais alimentados com TCM (Shinohara, Ogawa et al. 2005). Os baixos níveis de ácidos graxos poli-insaturados n-3 presentes no óleo de TCM também podem predispor ao acúmulo de lipídeos hepáticos devido ao favorecimento da síntese de ácidos graxos (Tanaka, Zhang et al. 2010).

Os estudos citados acima utilizaram o TCM em associação aos TCLs provenientes de óleos vegetais (óleo de milho) na dieta hiperlipídica e não descrevem o acúmulo de colesterol hepático. Portanto, no presente estudo, o uso dos TCMs em associação à gordura animal na dieta hiperlipídica provavelmente favoreceu o acúmulo de colesterol hepático.

Os animais alimentados com o óleo de peixe apresentaram um aumento do peso hepático em relação ao grupo HL⁺TCM e da razão peso hepático/peso corporal em relação ao grupo HL⁺GA, no entanto, esse aumento não foi associado à

diferença significativa de gordura hepática. A hepatomegalia nos animais alimentados com óleo de peixe pode ser encontrada mesmo com a redução do acúmulo hepático de lipídeos (Otto, Tsai et al. 1991; Buettner, Parhofer et al. 2006). O aumento do peso hepático em animais alimentados com óleo de peixe pode estar associado à indução da proliferação e ao aumento do volume dos peroxissomos e também à indução da hiperplasia das células hepáticas (Otto, Tsai et al. 1991; Buettner, Parhofer et al. 2006).

A redução do acúmulo de gordura hepática associada à ingestão do óleo de peixe é descrita em muitos estudos com a indução da esteatose hepática pela dieta hiperlipídica (Geelen, Schoots et al. 1995; Kramer, LeDeaux et al. 2003; Saraswathi, Gao et al. 2007).

Os AGPI n-3 promovem a ativação do PPAR- α e inibição da SREPB-1c resultando em aumento da oxidação de lipídeos e redução da síntese de enzimas lipogênicas (Svegliati-Baroni, et al. 2006; Levy, et al. 2004)

Os ácidos graxos n-3 presentes no óleo de peixe são associados à redução da esteatose hepática, pois promovem uma modulação no metabolismo de lipídeos. A ativação dos PPARs pelos AGPI n-3, é associada ao aumento da síntese de enzimas envolvidas na oxidação dos lipídeos (Levy, Clore et al. 2004; Jump, Botolin et al. 2005; Buettner, Parhofer et al. 2006). A redução da esteatose hepática associada à indução do PPAR- α foi observada após a suplementação com óleo de peixe em animais alimentados com dieta hiperlipídica (68% do valor calórico). (Svegliati-Baroni, Candelaresi et al. 2006). A inibição da SREBP-1 pelo n-3 resulta na redução da síntese de enzimas lipogênicas (Geelen, Schoots et al. 1995; Buettner, Parhofer et al. 2006; Schmitz and Ecker 2008). O estudo de Kramer et al (2003) verificou a redução dos níveis de colesterol total e triglicerídeos hepáticos

associada à inibição das SREBP- 1 e 2 pelos ácidos graxos n-3 presentes no óleo de peixe. O efeito na indução do PPAR- α é atribuído ao DHA, sendo que o EPA parece exercer a supressão da SREBP-1 (Tanaka, Zhang et al. 2010).

No presente estudo, o uso do óleo de peixe na dieta hiperlipídica não resultou em menor acúmulo de gordura hepática. A redução no acúmulo de triglicerídeos hepáticos no grupo HL⁺OP não apresentou diferença significativa em relação ao grupo HL⁺GA e provavelmente foi prejudicada devido à associação do óleo de peixe à dieta hiperlipídica. A maior ingestão de dieta, energética e maior ganho de peso observado no grupo HL⁺OP na última semana do experimento podem ter favorecido o acúmulo hepático de lipídeos.

Outros estudos observaram o uso do óleo de peixe na dieta hiperlipídica e aumento dos lipídeos hepáticos. O aumento significativo dos níveis de colesterol total e de triglicerídeos hepáticos foi observado em animais alimentados com a dieta hiperlipídica adicionada de óleo de peixe (Yaqoob, Sherrington et al. 1995). Outro estudo também observou o aumento do acúmulo hepático de gordura associado ao uso do óleo de peixe na dieta hiperlipídica (Otto, Tsai et al. 1991).

Estudos sugerem que mesmo com a inibição da síntese hepática de lipídeos associada ao uso do óleo de peixe, há uma inibição no mecanismo de secreção hepática pela VLDL que parece limitar a eliminação dos lipídeos hepáticos quando os animais são alimentados com a dieta hiperlipídica (Ventura, Woollett et al. 1989; Otto, Tsai et al. 1991; Hebbachi, Seelaender et al. 1997). A redução da síntese e o aumento da degradação da ApoB contribuem para a redução da secreção da VLDL que ocorre durante o consumo da dieta rica em óleo de peixe (Hebbachi, Seelaender et al. 1997). Um recente estudo realizado por Caviglia et al (2011) demonstrou que o

DHA está associado a uma potente inibição na secreção da apoB100 através da degradação autofágica.

Apesar do óleo de peixe apresentar elevado conteúdo de ácidos graxos saturados e, também de colesterol, o acúmulo hepático de colesterol total no grupo HL⁺OP foi limitado. Segundo Ventura et al (1989) a ingestão do óleo de peixe é associada à supressão da taxa de síntese hepática do colesterol. O estudo de Saraswathi et al (2007) demonstrou que a redução do colesterol total hepático e plasmático foi associada a um maior acúmulo no tecido adiposo em ratos alimentados com óleo de peixe.

A dieta rica em gordura saturada é associada ao aumento do colesterol sérico (Morgado, Rigotti et al. 2005). A dieta hiperlipídica utilizada no estudo, é rica em ácidos graxos saturados e colesterol provenientes da gordura animal, e apesar das alterações no acúmulo de gordura hepática, não foi associada ao aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides séricos nos grupos que receberam as dietas HL⁺. O grupo HL⁺GA apresentou maior acúmulo hepático do colesterol total, no entanto, não apresentou alteração significativa nos valores séricos. Apesar do aumento em diferentes proporções dos valores hepáticos de triglicerídeos observados nos grupos que receberam as dietas hiperlipídicas os valores séricos também não apresentaram alteração significativa.

No grupo HL⁺TCM a redução do colesterol total sérico foi associada a um maior acúmulo hepático e o aumento do acúmulo de triglicerídeos no fígado não resultou em aumento dos valores séricos. Os estudos que utilizam os TCMs associados aos TCLs na dieta hiperlipídica relaram um aumento nos níveis de triglicerídeos séricos (Turkenkopf, Maggio et al. 1982; Geelen, Schoots et al. 1995;

Lieber, DeCarli et al. 2008) e do Colesterol Total, quando são associados à dieta hiperlipídica rica em colesterol (Wollin, Wang et al. 2004). A redução dos níveis de triglicerídeos séricos foi encontrada com o uso isolado dos TCMs e foi associada a uma redução do depósito de triglicerídeos no tecido adiposo (Han, Hamilton et al. 2003). Em humanos não foi observada diferença significativa nos lipídeos séricos com a suplementação de TCMs na dieta (Nosaka, Kasai et al. 2002).

A redução do colesterol total sérico no grupo HL⁺OP não foi associada a aumento significativo no acúmulo hepático. Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 presentes no óleo de peixe são associados à redução nos níveis de colesterol total e triglicerídeos séricos (Fickova, Hubert et al. 1998; Morgado, Rigotti et al. 2005; Sudheendran, Chang et al. 2010). A redução da LDL_{col} sérica em animais alimentados com óleo de peixe é associada à redução da sua produção hepática (Ventura, Woollett et al. 1989). A redução da esteatose hepática foi associada a um efeito hipolipemiante em ratos magros alimentados com óleo de peixe na dieta hiperlipídica, mas tal efeito não foi observado em ratos obesos (Saraswathi, Morrow et al. 2009) .

A literatura demonstra certa divergência das alterações metabólicas e hepáticas nos estudos que utilizam a dieta hiperlipídica para indução esteatose hepática em ratos. A ausência de alterações hepáticas e metabólicas foi observada em um estudo realizado com ratos da linhagem *Wistar* em que consumiram a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada (67%) durante 14 semanas (Romestaing, Piquet et al. 2007). O resultado foi associado a um maior acúmulo de triglicerídeos no tecido adiposo que contribuiu para a prevenção do acúmulo hepático (Romestaing, Piquet et al. 2007).

Segundo Larter et al (2008) os efeitos da dieta hiperlipídica em roedores podem ser bastante variáveis e podem não reproduzir fielmente as alterações hepáticas e metabólicas observadas na NAFLD/NASH que ocorre em humanos. Além dos fatores dietéticos como o perfil lipídico e o percentual de gordura da dieta, a duração do tratamento, sexo e idade do animal, o uso de diferentes espécies de roedores em estudos que utilizam a dieta hiperlipídica como modelo experimental também influenciam na indução de esteatose hepática (Larter and Yeh 2008; Jiangao and Qiao 2009; Varela-Rey, Embade et al. 2009).

A caracterização do perfil lipídico sérico em indivíduos portadores de NASH demonstrou a ausência de hiperlipidemia e, portanto, a doença pode ou não estar associada ao aumento nos níveis de triglicerídeos e colesterol total séricos (Machado, Ravasco et al. 2008).

Os lipídeos dietéticos influenciam diretamente a composição em ácidos graxos no tecido hepático (Wu, Tong et al. 2011). No presente estudo a composição hepática dos ácidos graxos em geral permitiu verificar a incorporação hepática dos ácidos graxos presentes na dieta consumida pelos animais.

Apesar da baixa incorporação dos AGSCM no tecido hepático, o estudo verificou um percentual significativamente maior do ácido caprílico e ácido láurico no grupo HL⁺TCM que corresponde aos principais ácidos graxos que compõem o óleo de TCM utilizado na dieta dos animais e também contribuem para a maior somatória dos AGSCM hepáticos neste grupo. O maior percentual hepático do ácido mirístico, um ácido graxo de cadeia longa também reflete a composição em ácidos graxos do óleo de TCM utilizado na dieta dos animais. A composição hepática em ácidos graxos do grupo HL⁺TCM é semelhante ao encontrado após a administração

intravenosa de TCMs em ratos e também após a ingestão de dieta rica em gordura saturada associado aos TCMs em roedores (Ronis, Korourian et al. 2004; Louchami, Zhang et al. 2006).

O percentual do ácido palmitoléico hepático encontrou-se reduzido nos grupos HL⁺ em relação ao Controle e pode estar relacionado tanto ao baixo percentual presente na dieta quanto à menor síntese hepática a partir do ácido palmítico. Os níveis de ácido palmitoléico na dieta são baixos e consequentemente a concentração tecidual é mínima, no entanto, níveis elevados deste ácido graxo indicam a ativação da *síntese de novo* de ácidos graxos (Cao, Gerhold et al. 2008). Outro estudo também descreve a redução do ácido palmitoléico hepático nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (70% VCT) (Wu, Tong et al. 2011). O aumento do ácido palmitoléico foi observado no fígado de ratos alimentados com a dieta hiperlipídica/hiperglicídica (Kajikawa, Harada et al. 2009). Entre os grupos HL⁺, o percentual do ácido palmitoléico é maior no grupo HL⁺TCM e é provavelmente resultante da maior síntese hepática a partir do ácido palmítico, estimada pela razão ácido palmitoléico/palmítico.

O maior percentual de ácido oléico hepático foi encontrado nos grupos HL⁺TCM e HL⁺GA, em ordem decrescente, e pode indicar a incorporação hepática do ácido graxo presente na gordura animal e também pode resultar de uma maior síntese hepática a partir do ácido esteárico. O aumento da razão hepática ácido oléico/esteárico foi maior no grupo HL⁺TCM que no grupo HL⁺GA, o que pode estimar uma maior síntese hepática do ácido oléico neste grupo. O maior percentual do ácido oléico contribuiu para a maior somatória dos AGMIs hepáticos encontrada no grupo HL⁺TCM, seguido do HL⁺GA.

O ácido oléico está diretamente associado ao desenvolvimento da esteatose hepática, pois é produto final da *síntese de novo* de ácidos graxos e indica um aumento do estímulo da síntese hepática de lipídeos a partir da Acetil CoA (Anstee and Goldin 2006; Cui, Chen et al. 2010). O aumento da produção de AcetilCoA que ocorre na extensiva β -oxidação mitocondrial dos AGSCM pode contribuir para a síntese de ácidos graxos (Bach and Babayan 1982; Geelen, Schoots et al. 1995). O ácido oléico é fortemente associado à ativação da expressão do SREBP-1 e ao acúmulo de triglicérides hepáticos (Ricchi, Odoardi et al. 2009).

Os pacientes com NASH apresentam as concentrações séricas elevadas de ácido palmitico, palmitoléico e oléico no jejum e, portanto indicam maior síntese hepática (Hussein, Grosowski et al. 2007).

O grupo HL⁺TCM apresentou uma redução significativa do percentual hepático de ácido linoléico, do ácido α -linolênico e também do DHA, que contribuíram para uma redução significativa na somatória de ácidos graxos poli-insaturados hepáticos. O resultado encontrado reflete a composição do óleo de TCM, mínima em ácidos graxos poli-insaturados. Apesar da somatória de ácidos graxos saturados não apresentar diferença significativa, a maior razão da somatória AGS/AGPI no tecido hepático é encontrada no grupo HL⁺TCM, provavelmente devido aos valores mínimos de ácidos graxos com insaturações no óleo de TCM.

A composição de ácidos graxos hepáticos nos animais que receberam óleo de peixe é semelhante ao encontrado na literatura (Morgado, Rigotti et al. 2005). O perfil hepático de ácidos graxos do grupo HL⁺OP reflete o maior percentual de EPA e DHA presentes no óleo de peixe. O aumento da ingestão dietética de EPA e DHA resulta em maiores concentrações destes ácidos graxos no tecido hepático (Arterburn, Hall et al. 2006; Schmitz and Ecker 2008). A maior incorporação hepática

do DHA ocorre devido à maior concentração presente no óleo de peixe, e não ao aumento da conversão a partir do ácido α -linolênico, como mostra a estimativa da atividade das enzimas da via de biossíntese pela razão DHA/ α -linolênico. O óleo de peixe apresenta um baixo percentual do ácido α -linolênico, e além disso, o aumento da ingestão dietética de EPA e DHA promove uma redução na conversão do ALA aos AGPI n-3 altamente insaturados (Arterburn, Hall et al. 2006). A dieta rica em ácidos graxos saturados, colesterol e em AGPI n-6 pode contribuir para a menor atividade das enzimas da via de biossíntese hepáticas dos ácidos graxos n-3, através da inibição das enzimas delta-5 e delta-6 dessaturase (Das 2006; Puri, Baillie et al. 2007; Schmitz and Ecker 2008). A menor incorporação hepática do ácido linoléico reflete o menor percentual presente no óleo de peixe, no entanto, não foi observada diferença significativa no conteúdo de ácido araquidônico hepático.

O uso do óleo de peixe na dieta dos animais promoveu uma redução significativa da relação n-6/n-3 no tecido hepático e a maior incorporação hepática de ácidos graxos poli-insaturados n-3 contribuiu para uma baixa relação AGS/AGPI.

O maior percentual do ácido palmítico hepático foi encontrado somente no grupo HL⁺OP e reflete o conteúdo deste ácido graxo presente no óleo de peixe. Neste mesmo grupo, foi verificada a baixa incorporação hepática do ácido palmitoléico presente no óleo de peixe e verificada uma menor estimativa da síntese hepática a partir do ácido palmítico.

O ácido palmítico pode estar associado a efeitos negativos na NAFLD. Um estudo realizado *in vitro* demonstrou que o ácido palmítico promove uma maior indução do PPAR- α e resulta em menor acúmulo de triglicerídeos no fígado, quando comparado ao ácido oléico, mas está associado à redução da sinalização da insulina e à apoptose do hepatócito (Ricchi, Odoardi et al. 2009). O ácido palmítico também

está associado ao estresse do retículo endoplasmático e inibição da secreção da apoB100 no fígado (Caviglia, Gayet et al. 2011).

O aumento do ácido esteárico hepático nos grupos HL⁺GA e HL⁺OP reflete a composição deste ácido graxo presente em maiores percentuais na gordura animal e menor no óleo de peixe. O ácido esteárico também pode ser sintetizado a partir do ácido linoléico proveniente da dieta pelo processo de hidrogenação (Wu, Tong et al. 2011). O aumento do ácido esteárico pode contribuir para a síntese do ácido oléico por meio da ação das dessaturases hepáticas, principal ácido graxo associado à síntese de triglicerídeos hepáticos (Bonanome and Grundy 1988). No estudo verificou-se que aumento do ácido esteárico hepático no grupo HL⁺GA foi associado a um aumento do ácido oléico hepático, o que pode indicar maior síntese hepática, estimada pelo aumento da razão oléico/esteárico. No entanto, no grupo HL⁺OP não verificou-se aumento significativo do ácido oléico hepático e nem da razão oléico/esteárico, indicando uma provável redução na síntese do ácido graxo.

A gordura animal, o óleo de peixe e o óleo de TCM apresentam um percentual de ácido linoléico mais baixo que o óleo de soja, portanto, os grupos HL⁺GA, HL⁺OP e HL⁺TCM apresentaram menor percentual de incorporação hepática deste ácido graxo em relação ao Controle e ao grupo HL⁺OS. Apesar da maior incorporação hepática do ácido linoléico no grupo HL⁺OS em relação aos grupos que receberam as dietas hiperlipídicas, o conteúdo hepático de ácido araquidônico não apresenta diferença estatística entre os grupos experimentais. A menor razão hepática ARA/linoléico verificada no grupo HL⁺OS, pode indicar menor conversão do ácido linoléico a araquidônico. A redução da taxa de conversão do LA ao ARA pode ocorrer devido ao aumento da oxidação do ácido graxo precursor (Arterburn, Hall et al. 2006).

O menor percentual hepático do ácido α -linolênico observado nos grupos HL⁺GA, HL⁺TCM e HL⁺OP em relação ao controle corresponde ao baixo percentual deste ácido graxo presente na gordura animal, no óleo de TCM e no óleo de peixe. Nos grupos HL⁺GA e HL⁺TCM, o menor percentual do ácido α -linolênico, foi associado ao menor percentual do DHA hepático e também contribuiu para menor somatória dos AGPI n-3 nestes grupos. O valor percentual hepático do ácido α -linolênico do grupo HL⁺OS foi semelhante ao encontrado no grupo controle e reflete a composição do óleo de soja.

O aumento da razão n-6/n-3 hepática pode ser observado nos grupos que receberam as dietas HL⁺, com exceção do grupo que recebeu o óleo de peixe, devido à maior incorporação hepática do EPA e DHA. A gordura animal utilizada nas dietas HL⁺ contribuiu para uma maior oferta de ácidos graxos n-6 na dieta dos grupos HL⁺GA e HL⁺TCM, e também o óleo de soja na dieta do grupo HL⁺OS. A associação a fontes lipídicas com baixo percentual de n-3, como a própria gordura animal, óleo de soja e óleo de TCM, refletem a maior razão n-6/n-3 hepática encontrada nestes grupos. A ingestão das dietas hiperlipídicas ricas em gordura saturada, não resultou em diferença estatística no acúmulo hepático da somatória de ácidos graxos saturados. O estudo de Almeida et al (2009) descreve uma associação entre a ingestão de fontes lipídicas ricas em gordura saturada e o acúmulo destes ácidos graxos no tecido adiposo, no entanto o presente estudo não avaliou a composição em ácidos graxos no tecido adiposo para confirmar esta hipótese.

Em indivíduos com o diagnóstico de NASH e NAFLD foi observada uma maior relação hepática de n-6/n-3 (Puri, Baillie et al. 2007), associada à redução do DHA e EPA. A redução da razão (EPA+DHA) / α -linolênico pode ser resultante de um defeito

na dessaturação destes ácidos graxos, devido à ingestão inadequada dos precursores como o α -linolênico, e também à elevada ingestão ácidos graxos trans levando à inibição das dessaturases, e ao aumento do estresse oxidativo resultando na peroxidação lipídica dos AGPIs (Araya, Rodrigo et al. 2004; Puri, Baillie et al. 2007).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico permitem observar a reação produzida pelos compostos resultantes da peroxidação lipídica, entre eles o Malonaldeído (Lapenna, Ciofani et al. 2001). A defesa antioxidante pode ser observada pelos níveis de GSH e de Vitamina E.

Apesar dos grupos HL⁺GA e HL⁺OS não terem apresentado alteração significativa nas SRATBs hepáticas e do grupo HL⁺GA ter apresentado uma redução das SRATBs livres séricas, verificou-se uma redução da vitamina E hepática nestes grupos. O índice de peroxidabilidade da gordura animal é baixo, no entanto, o baixo conteúdo de vitamina E encontrado na gordura animal e a baixa quantidade estimada na dieta contribuem para uma maior utilização da Vitamina E hepática. O índice de peroxidabilidade do óleo de soja é elevado, e apesar do índice de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos do grupo HL⁺OS não apresentar aumento significativo, pode ter contribuído para a maior utilização do antioxidante hepático. O conteúdo de vitamina E do óleo de soja é significativamente maior que o encontrado nos demais óleos e na gordura animal e a quantidade estimada na dieta é maior que na dieta dos grupos Controle, HL⁺GA e HL⁺TCM e, no entanto, não foi suficiente para a preservação dos níveis de vitamina E hepáticos.

Svegliati-Baroni et al (2006) relatam o aumento da peroxidação lipídica hepática, relacionada aos níveis das SRATBs, e a correlação com o aumento dos

triglicérides e colesterol hepáticos nos animais com esteatose hepática alimentados com a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada (58% valor calórico). Outro estudo também demonstra a indução da esteatose hepática associada ao aumento da peroxidação lipídica hepática nos animais que receberam a dieta hiperlipídica com o óleo de milho (71% valor energético) (Ahmed, Redgrave et al. 2009).

No grupo HL⁺TCM não foi observado diferença estatística na redução das SRATBs hepáticas, no entanto, apresentou uma preservação dos componentes do sistema antioxidante no fígado. Verificou-se o aumento significativo da GSH hepática e um aumento exacerbado da vitamina E hepática avaliada por grama de gordura e grama de tecido. A vitamina E do óleo de TCM esta presente em pouca quantidade (menor que na gordura animal, óleo de soja e óleo de peixe) e a quantidade estimada na dieta é menor que na dieta dos grupos Controle, HL⁺OS e HL⁺OP. No entanto, os TCMs são associados ao aumento da absorção de vitamina E que contribui para o aumento da concentração hepática (Gallo-Torres, Ludorf et al. 1978). A GSH participa diretamente da regeneração da vitamina E por meio da redução do radical tocoferol (Valko, Leibfritz et al. 2007), e portanto, a maior concentração hepática de Vitamina E provavelmente contribuiu para maior preservação hepática da GSH.

Os ácidos graxos saturados apresentam menor susceptibilidade à reação oxidativa e são associados à menor liberação dos produtos da peroxidação lipídica (Hammer and Wills 1978). A menor susceptibilidade dos ácidos graxos saturados de cadeia média provenientes do óleo de TCM à peroxidação lipídica se deve também a presença de quantidade mínima de ácidos graxos com insaturações e pode ser observada pelo menor IP dos ácidos graxos hepáticos e pela preservação do

sistema antioxidante no grupo HL⁺TCM, apesar do maior acúmulo de triglicerídeos hepáticos.

O uso dos TCMs na esteatose hepática apresenta resultados controversos em relação à peroxidação lipídica provavelmente devido aos diferentes tipos de TCLs associados na dieta hiperlipídica. O aumento da peroxidação lipídica foi observado com a associação dos TCMs e TCLs provenientes do óleo de milho e óleo de oliva na dieta hiperlipídica (Lieber, DeCarli et al. 2008). Em outro estudo realizado em animais alimentados com a dieta hiperlipídica composta por gordura animal e óleo de girassol, rica em TCM, foi verificado um aumento dos níveis de GSH e inalteração das SRATBs hepáticas (Wollin, Wang et al. 2004).

Em concordância aos resultados encontrados no presente estudo relacionados à menor incorporação hepática dos AGPI, maior razão $\Sigma\text{AGS}/\Sigma\text{AGPI}$ no fígado e preservação dos antioxidantes hepáticos no grupo HL⁺TCM, a dieta rica em gordura saturada promove uma redução no acúmulo de ácidos graxos poli-insaturados no fígado e desta forma, reduz a disponibilidade de substrato para a peroxidação lipídica (Nanji, Yang et al. 1996).

O aumento significativo nas SRATBs livres e totais hepáticas observadas no grupo HL⁺OP indica um aumento na peroxidação lipídica. A baixa razão $\Sigma\text{AGS}/\Sigma\text{AGPI}$ hepática, indica uma maior incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados no fígado, e foi correlacionada com os maiores índices de peroxidabilidade dos ácidos graxos hepáticos. Em decorrência do aumento da peroxidação lipídica houve uma redução da defesa antioxidante hepática no grupo HL⁺OP, observada pelos níveis de vitamina E tanto por grama de tecido, quanto por grama de gordura. A redução da GSH hepática foi observada somente quando comparada ao grupo HL⁺TCM. O óleo de peixe apresenta uma quantidade significativamente maior de

vitamina E (comparada ao óleo de TCM e à gordura animal) e a ingestão dietética estimada da vitamina pelos animais do grupo HL⁺OP é maior que os grupos Controle, HL⁺GA e HL⁺TCM, no entanto, não foi suficiente para prevenir o aumento da peroxidação dos lipídeos hepáticos.

O aumento na GSH sérica no grupo HL⁺OP pode resultar de uma maior mobilização da defesa antioxidante endógena provavelmente em resposta à depleção da vitamina E.

A associação entre o óleo de peixe e o aumento da peroxidação lipídica hepática encontrada no presente estudo é provavelmente resultante da maior incorporação hepática de EPA e DHA presentes na dieta, evidenciada pelo percentual significativamente maior encontrado nos ácidos graxos hepáticos.

O uso do óleo de peixe dietético é associado ao aumento da peroxidação lipídica hepática. O aumento nos níveis das SRATBs foi observado no fígado de animais alimentados com óleo de peixe, mesmo com a redução nos níveis de lipídeos séricos e hepáticos (Sealls, Gonzalez et al. 2008). Outros estudos observaram uma redução na produção das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo associado ao uso do EPA (Saw, Huang et al. 2010; Tanaka, Zhang et al. 2010). A verificação da susceptibilidade dos AGPI à peroxidação lipídica em cultura de hepatócitos de ratos revelou que a taxa de produção de MDA pelos hepatócitos é proporcional ao grau de insaturação: DHA> EPA> AA> α -linolênico> linoléico> oléico (Sugihara, Tsuruta et al. 1994). Neste mesmo estudo, o aumento da peroxidação em cultura de hepatócitos tratados com ácidos graxos poli-insaturados provenientes do óleo de peixe foi associado à depleção da GSH (Sugihara, Tsuruta et al. 1994). O aumento dos produtos da peroxidação lipídica hepática foi observado em animais com esteatose hepática alimentados com o óleo de peixe, comparados

às fontes lipídicas de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (Wu, Tong et al. 2011).

A peroxidação lipídica ocorre preferencialmente nos AGPIs e promove a alteração dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios das membranas celulares levando à produção de compostos tóxicos como o MDA e o hidroxinonenal (Anstee and Goldin 2006; Machado, Ravasco et al. 2008; Wu, Tong et al. 2011). Os produtos da peroxidação lipídica promovem o ataque as proteínas e podem alterar a sua função, resultando no dano de organelas celulares e na morte celular (Anstee and Goldin 2006; Tirosh, Ilan et al. 2009; Wu, Tong et al. 2011). O aumento da produção de radicais livres pode resultar na disfunção mitocondrial e consequentemente, na insuficiente oxidação de ácidos graxos (Cave, Deaciuc et al. 2007; Vanni, Bugianesi et al. 2010; Vial, Dubouchaud et al. 2011).

O dano das células hepáticas pode ser observado pelo aumento das transaminases séricas. O aumento dos níveis de ALT nos grupos HL⁺GA, HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP indicam que a ingestão da dieta hiperlipídica e o acúmulo de gordura hepática estão associadas a uma maior suscetibilidade ao dano do hepatócito. O aumento da peroxidação lipídica hepática no grupo HL⁺OP não contribuiu para um maior aumento na ALT. Já, o aumento da ALT no grupo HL⁺TCM indica que o aumento dos antioxidantes hepáticos não foram fatores de proteção para a redução da suscetibilidade ao dano do hepatócito.

A influência do uso do óleo de peixe e dos triglicerídeos de cadeia média nos valores de transaminases séricas é relatada em alguns estudos. O efeito da dieta hiperlipídica na indução de esteatose e dano hepático é demonstrado pelo aumento progressivo na ALT sérica associado ao aumento das SRATBs hepáticas e do TNF-

α sérico em animais com esteatose macrovesicular e a necroinflamação hepática, alimentados com a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada durante 6 meses (Svegliati-Baroni, Candelaresi et al. 2006). A suplementação da dieta destes animais com óleo de peixe promoveu uma melhora nos parâmetros observados (Svegliati-Baroni, Candelaresi et al. 2006). A redução dos níveis de ALT sérica também é observada em humanos após a suplementação com óleo de peixe e foi associada com a redução do acúmulo de gordura hepática (Svegliati-Baroni, Candelaresi et al. 2006; Sealls, Gonzalez et al. 2008). No entanto, um estudo demonstra que mesmo com a redução dos níveis de triglicerídeos hepáticos houve um aumento da ALT sérica nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica com óleo de peixe, em relação aos animais que receberam a dieta hiperlipídica com gordura animal (Buettnner, Parhofer et al. 2006). A suplementação da dieta com 40g de TCM durante 4 semanas resultou em redução dos níveis de ALT em homens saudáveis, no entanto, não apresentaram alteração de gordura hepática (Nosaka, Kasai et al. 2002). Lieber et al (2008) não avaliou as transaminases séricas, mas demonstrou que a ingestão do TCM associado ao TCL, resultou em aumento de triglicerídeos e do TNF- α hepático.

No entanto, é importante destacar que não há marcadores bioquímicos específicos para o diagnóstico da NASH e que muitos pacientes com esteatose avançada não apresentam alterações nas transaminases séricas (Grattagliano, Portincasa et al. 2007).

Conclusões

6. Conclusões

A dieta hiperlipídica com 74% do valor calórico de fonte lipídica, composta por gordura animal somente, e adicionadas de óleo de soja ou óleo de TCM ou óleo de peixe, promoveu a indução da esteatose hepática após 7 semanas. O uso combinado da gordura animal e óleo de peixe ou óleo de TCM resultaram em diferentes proporções de acúmulo das frações lipídicas, da peroxidação lipídica e antioxidantes hepáticos.

O uso do óleo de TCM na dieta hiperlipídica foi associado a um efeito negativo no desenvolvimento da esteatose hepática devido a exacerbação do acúmulo de triglicerídeos e do aumento do colesterol hepático. Apesar do aumento da defesa antioxidante hepática, o uso combinado da gordura animal + óleo de TCM não resultou em maior proteção ao dano do hepatócito. As alterações séricas e hepáticas não apresentaram a mesma tendência e portanto, é importante ressaltar que o monitoramento das frações lipídicas realizado apenas no soro pode não refletir as alterações no metabolismo lipídico hepático resultantes do uso dos TCMs.

O efeito positivo dos ácidos graxos n-3 na redução da esteatose hepática foi limitado provavelmente devido à associação do óleo de peixe à dieta hiperlipídica. O óleo de peixe apresenta elevado conteúdo de gordura saturada e colesterol o que também pode contrabalancear os efeitos positivos esperados. O uso do óleo de peixe contribuiu para uma maior peroxidação dos ácidos graxos e depleção dos antioxidantes hepáticos, no entanto, não foi associado a um maior dano hepático. As alterações séricas e hepáticas dos parâmetros utilizados para avaliar o estresse oxidativo não apresentaram a mesma tendência e portanto, o monitoramento dos

valores séricos podem não refletir o aumento da peroxidação lipídica hepática resultante do uso do óleo de peixe.

O presente estudo permite alertar para os benefícios e os riscos do uso em longo prazo dos triglicerídeos de cadeia média e do óleo de peixe na esteatose hepática. A substituição do óleo de peixe utilizado no estudo pelo EPA e DHA isolados pode trazer benefícios devido a redução de gordura saturada ofertada na dieta. A combinação dos triglicerídeos de cadeia média e ácidos graxos n-3 parece uma alternativa promissora na redução da esteatose hepática, no entanto, é necessário verificar o efeito desta combinação na produção de radicais livres, peroxidação lipídica e dano do hepatócito.

Referências
Bibliográficas

Referências bibliográficas

- Ahmed, U., T. G. Redgrave, et al. (2009). "Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat." J Gastroenterol Hepatol 24(8): 1463-71.
- Almeida, M. d., J. d. Queiroz, et al. (2009). "Perfil lipídico tecidual de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas." Rev. Nutr. 22(1): 51-60.
- Andreoli, M. F., M. V. Scalerandi, et al. (2007). "Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion." Nutrition 23(11-12): 827-35.
- Anstee, Q. M. and R. D. Goldin (2006). "Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research." Int J Exp Pathol 87(1): 1-16.
- Aoyama, T., N. Nosaka, et al. (2007). "Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids." J Med Invest 54(3-4): 385-8.
- Araya, J., R. Rodrigo, et al. (2004). "Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Clin Sci (Lond) 106(6): 635-43.
- Arnaud, J., I. Fortisa, et al. (1991). "Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography." 572(1-2): 103-116.
- Arterburn, L. M., E. B. Hall, et al. (2006). "Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans." Am J Clin Nutr 83(6 Suppl): 1467S-1476S.
- Bach, A. C. and V. K. Babayan (1982). "Medium-chain triglycerides: an update." Am J Clin Nutr 36(5): 950-62.
- Beermann, C., J. Jelinek, et al. (2003). "Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers." Lipids Health Dis 2: 10.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol 37(8): 911-7.
- Bonanome, A. and S. M. Grundy (1988). "Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels." N Engl J Med 318(19): 1244-8.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol 52: 302-10.
- Buettner, R., K. G. Parhofer, et al. (2006). "Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types." J Mol Endocrinol 36(3): 485-501.
-

-
- Byrne, C. D. (2010). "Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 82(4-6): 265-271.
- Cai, D., M. Yuan, et al. (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB." Nat Med 11(2): 183-90.
- Cao, H., K. Gerhold, et al. (2008). "Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism." Cell 134(6): 933-44.
- Castro, M. A., L. P. Almeida, et al. (2008). "Effects of Diets Containing Different Types of Carbohydrates on Hepatic Metabolism." Scand. J. Lab. Anim. Sci 35(4): 321-328.
- Caton, S. J., B. Yinglong, et al. (2009). "Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats." Obesity (Silver Spring) 17(2): 283-9.
- Cave, M., I. Deaciuc, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition." Journal of Nutritional Biochemistry 18: 184-195.
- Caviglia, J. M., C. Gayet, et al. (2011). " Different fatty acids inhibit apolipoprotein B100 secretion by different pathways: Unique roles for endoplasmic reticulum stress, ceramide, and autophagy " J Lipid Res 52(9): 1636 - 1651.
- Chanez, M., B. Bois-Joyeux, et al. (1991). "Metabolic effects in rats of a diet with a moderate level of medium-chain triglycerides." J Nutr 121(5): 585-94.
- Cighetti, G., S. Debiase, et al. (1999). "Free and total malondialdehyde assessment in biological matrices by gas chromatography-mass spectrometry: what is needed for an accurate detection." Anal Biochem 266(2): 222-9.
- Costa, C., R. Dos Santos, et al. (2006). "A simple automated procedure for thiol measurement in human and serum samples." J Braz Patol Med Lab 42: 345-350.
- Cotrim, H., E. Parise, et al. (2011). "Nonalcoholic fatty liver disease in Brasil. Clinical and histological profile." Annals of Hepatology 10(1): 33-37.
- Crozier, G. L. (1988). "Medium-chain triglyceride feeding over the long term: the metabolic fate of [14C]octanoate and [14C]oleate in isolated rat hepatocytes." J Nutr 118(3): 297-304.
- Cui, W., S. L. Chen, et al. (2010). "Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells." Am J Transl Res 2(1): 05-104.
- Dara, L., C. Ji, et al. (2011). "The Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Liver Diseases." Hepatology 53: 1752-1763.
- Das, U. N. (2006). "Biological significance of essential fatty acids." J Assoc Physicians India 54: 309-19.
-

- Das, U. N. (2006). "Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology." Biotechnol J 1(4): 420-39.
- Dowman, J. K., J. W. Tomlinson, et al. (2010). "Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease." Q J Med 103: 71-83.
- El-Badry, A. M., R. Graf, et al. (2007). "Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?" J Hepatol 47(5): 718-25.
- Feoli, A. M., C. Roehrig, et al. (2003). "Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils." Nutrition 19(9): 789-93.
- Fickova, M., P. Hubert, et al. (1998). "Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes." J Nutr 128(3): 512-9.
- Floyd, A. G. (1999). "Top ten considerations in the development of parenteral emulsions." Pharm Sci Technolo Today 4(2): 134-143.
- Foufelle, F., D. Perdereau, et al. (1992). "Effect of diets rich in medium-chain and long-chain triglycerides on lipogenic-enzyme gene expression in liver and adipose tissue of the weaned rat." Eur J Biochem 208(2): 381-7.
- Gallo-Torres, H. E., J. Ludorf, et al. (1978). "The effect of medium-chain triglycerides on the bioavailability of vitamin E." Int J Vitam Nutr Res 48(3): 240-1.
- Geelen, M. J., W. J. Schoots, et al. (1995). "Dietary medium-chain fatty acids raise and (n-3) polyunsaturated fatty acids lower hepatic triacylglycerol synthesis in rats." J Nutr 125(10): 2449-56.
- Gentile, C. L. and M. J. Pagliassotti (2008). "The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease." J Nutr Biochem 19(9): 567-76.
- Grattagliano, I., P. Portincasa, et al. (2007). "Managing nonalcoholic fatty liver disease: recommendations for family physicians." Can Fam Physician 53(5): 857-63.
- Hammer, C. T. and E. D. Wills (1978). "The role of lipid components of the diet in the regulation of the fatty acid composition of the rat liver endoplasmic reticulum and lipid peroxidation." Biochem J 174(2): 585-93.
- Han, J., J. A. Hamilton, et al. (2003). "Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats." Obes Res 11(6): 734-44.
- Hariri, N. and L. Thibault (2010). "High-fat diet-induced obesity in animal models " Nutrition Research Reviews: 1-3.
-

Hariri, N. and L. Thibault (2010). "High-fat diet-induced obesity in animal models." Nutrition Research Reviews 23(2): 270-299.

Harrison, S. A. (2008). "Abnormal liver tests and fatty liver on ultrasound." Clin Gastroenterol Hepatol 6(1): 26-9.

Hebbachi, A. M., M. C. Seelaender, et al. (1997). "Decreased secretion of very-low-density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids." Biochem J 325 (Pt 3): 711-9.

Hijona, E., L. Hijona, et al. (2010). "Biochemical determination of lipid content in hepatic steatosis by the Soxtec method." World J Gastroenterol 16(2): 1495-9.

Hussein, O., M. Grosovski, et al. (2007). "Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats." World J Gastroenterol 13(3): 361-8.

Jian-gao, F. and L. Qiao (2009). "Commonly used animal models of non-alcoholic steatohepatitis " Hepatobiliary Pancreat Dis Int 8(3): 233-240.

Jump, D. B., D. Botolin, et al. (2005). "Fatty acid regulation of hepatic gene transcription." J Nutr 135(11): 2503-6.

Kajikawa, S., T. Harada, et al. (2009). "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(4): 229-38.

Kang, M., H. Ahn, et al. (2005). "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 49(5): 304-311.

Kramer, J. A., J. LeDeaux, et al. (2003). "Transcription profiling in rat liver in response to dietary docosahexaenoic acid implicates stearoyl-coenzyme a desaturase as a nutritional target for lipid lowering." J Nutr 133(1): 57-66.

Kritchevsky, D. and S. A. Tepper (1965). "Influence of Medium-Chain Triglyceride (Mct) on Cholesterol Metabolism in Rats." J Nutr 86: 67-72.

Lapenna, D., G. Ciofani, et al. (2001). "Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma." Free Radic Biol Med 31(3): 331-5.

Larter, C. Z. and M. M. Yeh (2008). "Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right." J Gastroenterol Hepatol 23(11): 1635-48.

- Lavau, M. M. and S. A. Hashim (1978). "Effect of medium chain triglyceride on lipogenesis and body fat in the rat." J Nutr 108(4): 613-20.
- Levy, J. R., J. N. Clore, et al. (2004). "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats." Hepatology 39(3): 608-16.
- Lewis, T., P. D. Nichols, et al. (2000). "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs." J Microbiol Methods 43(2): 107-16.
- Lieber, C. S., Q. Cao, et al. (2007). "Role of medium-chain triglycerides in the alcohol-mediated cytochrome P450 2E1 induction of mitochondria." Alcohol Clin Exp Res 31(10): 1660-8.
- Lieber, C. S., L. M. DeCarli, et al. (2008). "Beneficial effects versus toxicity of medium-chain triacylglycerols in rats with NASH." J Hepatol 48(2): 318-26.
- Lieber, C. S., M. A. Leo, et al. (2004). "Model of nonalcoholic steatohepatitis." Am J Clin Nutr 79(3): 502-9.
- Lopez, D., M. Moller, et al. (2008). "Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid from fish oil modulates aortic nitric oxide and tocopherol status in the rat." Br J Nutr 100(4): 767-75.
- Louchami, K., Y. Zhang, et al. (2006). "Rapid changes in liver lipid composition and pancreatic islet K⁺ handling and secretory behaviour provoked by the intravenous administration of a medium-chain triglyceride: fish oil emulsion to long-chain polyunsaturated omega3 fatty acid-depleted rats." Int J Mol Med 18(6): 1047-55.
- Machado, M. V., P. Ravasco, et al. (2008). "Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet." Scand J Gastroenterol 43(1): 95-102.
- Meyer, A., H. Kirsch, et al. (2004). "Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis." J Lipid Res 45(10): 1899-909.
- Morgado, N., A. Rigotti, et al. (2005). "Comparative effect of fish oil feeding and other dietary fatty acids on plasma lipoproteins, biliary lipids, and hepatic expression of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat." Ann Nutr Metab 49(6): 397-406.
- Nagata, K., H. Suzuki, et al. (2007). "Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis." J Toxicol Sci 32(5): 453-68.
- Nanji, A. A., E. K. Yang, et al. (1996). "Medium chain triglycerides and vitamin E reduce the severity of established experimental alcoholic liver disease." J Pharmacol Exp Ther 277(3): 1694-700.
-

Naves M.M.V.N. and Moreno F.S. (2000). "Diferenciação celular: importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno." Revista Brasileira de Cancerologia 46(4): 389-399.

Nosaka, N., M. Kasai, et al. (2002). "Effects of dietary medium-chain triacylglycerols on serum lipoproteins and biochemical parameters in healthy men." Biosci Biotechnol Biochem 66(8): 1713-8.

Oh, Y., S. Talukdar, et al. (2010). "GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects." Cell 142: 687-698.

Otto, D. A., C. E. Tsai, et al. (1991). "Apparent inhibition of hepatic triacylglycerol secretion, independent of synthesis, in high-fat fish oil-fed rats: role for insulin." Biochim Biophys Acta 1082(1): 37-48.

Pamplona, R., M. Portero-Otin, et al. (1998). "Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals." J Lipid Res 39(10): 1989-94.

Parekh, S. and F. Anania (2007). "Abnormal Lipid and Glucose Metabolism in Obesity: Implications for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." Gastroenterology 132: 2191-2207.

Pettinelli, P., A. M. Obregón, et al. (2011). "Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease." Nutrición Hospitalaria 26(3): 450.

Pickova, J. (2009). "Importance of knowledge on lipid composition of foods to support development towards consumption of higher levels of n-3 fatty acids via freshwater fish." Physiol Res 58 Suppl 1: S39-45.

Preiss, D. and N. Sattar (2008). "Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations." Clin Sci (Lond) 115(5): 141-50.

Pulzi, F. B., R. Cisternas, et al. (2011). "New clinical score to diagnose nonalcoholic steatohepatitis in obese patients." Diabetol Metab Syndr 3(1): 3.

Puri, P., R. A. Baillie, et al. (2007). "A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology 46(4): 1081-90.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "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." J Nutr 123(11): 1939-51.

Ricchi, M., M. R. Odoardi, et al. (2009). "Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes." J Gastroenterol Hepatol 24(5): 830-40.

Riediger, N. D., R. A. Othman, et al. (2009). "A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease." J Am Diet Assoc 109(4): 668-79.

Romestaing, C., M. A. Piquet, et al. (2007). "Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats." Nutr Metab (Lond) 4: 4.

Ronis, M. J., S. Korourian, et al. (2004). "Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition." J Nutr 134(4): 904-12.

Roynette, C. E., I. Rudkowska, et al. (2008). "Structured medium and long chain triglycerides show short-term increases in fat oxidation, but no changes in adiposity in men." Nutr Metab Cardiovasc Dis 18(4): 298-305.

Ruxton, C. H., S. C. Reed, et al. (2007). "The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence." J Hum Nutr Diet 20(3): 275-85.

Samuel, V. T., Z. X. Liu, et al. (2004). "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." J Biol Chem 279(31): 32345-53.

Saraswathi, V., L. Gao, et al. (2007). "Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice." J Nutr 137(7): 1776-82.

Saraswathi, V., J. D. Morrow, et al. (2009). "Dietary fish oil exerts hypolipidemic effects in lean and insulin sensitizing effects in obese LDLR^{-/-} mice." J Nutr 139(12): 2380-6.

Saw, C. L., Y. Huang, et al. (2010). "Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: Docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid." Biochemical Pharmacology 79(3): 421.

Schmitz, G. and J. Ecker (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." Prog Lipid Res 47(2): 147-55.

Sealls, W., M. Gonzalez, et al. (2008). "Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis." Biochim Biophys Acta 1781(8): 406-14.

Sedlak, J. and R. H. Lindsay (1968). "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent." Anal Biochem 25(1): 192-205.

Sheth, S. G., F. D. Gordon, et al. (1997). "Nonalcoholic steatohepatitis." Ann Intern Med 126(2): 137-45.

Shinohara, H., A. Ogawa, et al. (2005). "Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats." Biosci Biotechnol Biochem 69(10): 1811-8.

Sinitskaya, N., S. Gourmelen, et al. (2007). "Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats." Clin Sci (Lond) 113(10): 417-25.

St-Onge, M. P. and P. J. Jones (2002). "Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity." J Nutr 132(3): 329-32.

Storlien, L. H., E. W. Kraegen, et al. (1987). "Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats." Science 237(4817): 885-8.

Sudheendran, S., C. C. Chang, et al. (2010). "N-3 vs. saturated fatty acids: Effects on the arterial wall." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 82(4-6): 205-9.

Sugihara, N., Y. Tsuruta, et al. (1994). "High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes." Toxicol Appl Pharmacol 126(1): 124-8.

Sumida, Y., M. Yoneda, et al. (2010). "A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol 46(2): 257-268.

Svegliati-Baroni, G., C. Candelaresi, et al. (2006). "A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury." Am J Pathol 169(3): 846-60.

TACO (2006). Tabela brasileira de composição de alimentos. T-113. Versão II. 2 ed. Campinas, SP. NEPA-UNICAMP. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>. Acesso em: 30 jun. de 2011.

Tanaka, N., X. Zhang, et al. (2010). "Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPAR α activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice." Biochemical Pharmacology 80(1601-1612).

Tessari, P., A. Coracina, et al. (2009). "Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease." Nutr Metab Cardiovasc Dis 19(4): 291-302.

Tholstrup, T., C. Ehnholm, et al. (2004). "Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities." Am J Clin Nutr 79(4): 564-9.

Tirosh, O., E. Ilan, et al. (2009). "Nutritional lipid-induced oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction followed by necrotic death in FaO hepatocytes." Nutrition 25(2): 200-8.

Tocher, D. R., J. G. Bell, et al. (2001). "Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 130(2): 257-70.

Turkenkopf, I. J., C. A. Maggio, et al. (1982). "Effect of high fat weanling diets containing either medium-chain triglycerides or long-chain triglycerides on the development of obesity in the Zucker rat." J Nutr 112(7): 1254-63.

USDA (2009). National Nutrient Database for Standard Reference. Release 22. Content of Selected Foods per Common Measure, Cholesterol (mg) sorted alphabetically., USDA. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR22/nutrlst/sr22a601.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2011.

Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39(1): 44-84.

Vanni, E., E. Bugianesi, et al. (2010). "From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? ." Digestive and Liver Disease 42: 320-330.

Varela-Rey, M., N. Embade, et al. (2009). "Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: understanding the human disease." Int J Biochem Cell Biol 41(5): 969-76.

Ventura, M. A., L. A. Woollett, et al. (1989). "Dietary fish oil stimulates hepatic low density lipoprotein transport in the rat." J Clin Invest 84(2): 528-37.

Vial, G., H. Dubouchaud, et al. (2011). "Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver." Journal of Hepatology 54: 348-356.

Wang, D., Y. Wei, et al. (2006). "Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis." Endocrinology 147(2): 943-51.

Wein, S., S. Wolfram, et al. (2009). "Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by high-fat diets in rats." Diabetes Metab Res Rev 25(2): 185-94.

Wollin, S. D., Y. Wang, et al. (2004). "Effects of a medium chain triglyceride oil mixture and alpha-lipoic acid diet on body composition, antioxidant status, and plasma lipid levels in the Golden Syrian hamster." J Nutr Biochem 15(7): 402-10.

Wu, X., Y. Tong, et al. (2011). "Lipid Fatty Acid Profile Analyses in Liver and Serum in Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis Using. Improved Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methodology." J Agric Food Chem 56(2): 747-754.

Yaqoob, P., E. Sherrington, et al. (1995). "Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat." Int J Biochem Cell Biol 27(3): 297-310.

Younossi ZM, Page S, et al. (2011). "A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis and Nash related fibrosis." Obes Surg 21(4): 431-439.

Zhu, F. S., S. Liu, et al. (2008). "Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids from seal oils on nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperlipidemia." World J Gastroenterol 14(41): 6395-400.

Zivkovic, A. M., J. B. German, et al. (2007). "Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease." Am J Clin Nutr 86(2): 285-300.

Zou, Y., J. Li, et al. (2006). "High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis." Life Sci 79(11): 1100-7.

Apêndice

Apêndice A. Evolução semanal das médias de peso dos animais (g).

Período	Controle	HL⁺ GA	HL⁺ OS	HL⁺ TCM	HL⁺ OP
Semana 1	72,8 ±10,06	72,9±9,87	76,1±5,74	76±6,29	71±6,5
Semana 2	117,4±13,95	124,3±17,15	128±8,15	119,7±11,43	87,4±6,92
Semana 3	223,4±28,4	251,5±28,74	245,4±24,74	239,9±27,62	224,1±37,1
Semana 4	275,5±50,34	287,5±39,63	292,6±35,13	276,2±13,97	290,2±39,5
Semana 5	334,1±35,46	348,6±38,19	349,7±49,51	327,9±51,75	333,7±38,88
Semana 6	371,2±30,85	404,2±41,59	402,3±55,48	390,6±53,12	382,9±37,11
Semana 7	413±37,76	456,5±42,95	448,3±65,32	407,1±37,69	455,8±49,35

Resultados expressos em média ± DP. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Apêndice B. Estimativa de Ingestão dos óleos e gordura das dietas por semana.

Período	Controle	HL+GA	HL+OS		HL+TCM		HL+OP	
	Óleo de Soja	Gord. Animal	Gord. Animal	Óleo de Soja	Gord. Animal	Óleo de TCM	Gord. Animal	Óleo de Peixe
Semana 1	2,58±0,38 ^a	17,5±2,72 ^a	12,74±0,97	5,46±0,41	11,74±1,28	5,03±0,55	12,74±2,76	5,46±1,18
Semana 2	2,81±0,60 ^a	19,85±2,53 ^a	13,45±1,87	5,76±0,80	13,82±1,77	5,92±0,76	12,43±1,98	5,33±0,85
Semana 3	3,32±0,30 ^a	20,08±4,10 ^a	13,31±2,52	5,70±1,08	13,78±1,53	5,91±0,66	11,05±2,32	4,73±0,99 ^b
Semana 4	3,29±0,13 ^a	16,90±3,20 ^a	11,95±2,18	5,12±0,93	11,77±1,52	5,04±0,65	11,98±2,10	5,14±0,90
Semana 5	3,59±0,27 ^a	16,53±4,12 ^a	11,34±1,67	4,86±0,72	11,56±2,84	4,95±1,22	12,85±1,07	5,51±0,46
Semana 6	3,73±0,41 ^a	20,78±3,69 ^a	14,15±3,45	6,06±1,48	13,87±2,35	5,94±1,01	12,99±1,71	5,57±0,73
Semana 7	4,03±1,08 ^a	20,78±3,07 ^a	14,25±2,24	6,11±0,96	13,44±1,54	5,76±0,66	17,34±2,52 ^d	7,43±1,08 ^c

Resultados expressos em média ± DP. Os valores expressos para cada grupo por semana representam a estimativa de ingestão de gordura animal e dos óleos de soja, TCM e peixe. ^ap<0,001 vs HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^bp<0,05 vs HL⁺TCM. ^cp<0,05 vs HL⁺OS e p<0,01 vs HL⁺TCM. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Apêndice C. Porcentagem média de outros ácidos graxos hepáticos.

Ácido Graxo	Fórmula	Controle	HL ⁺ GA	HL ⁺ OS	HL ⁺ TCM	HL ⁺ OP
Pentadecanóico	C15:0	0,20±0,04	0,11±0,02 ^a	0,11±0,009 ^a	0,14±0,006 ^b	0,17±0,04 ^c
Heptadecanóico	C17:0	0,28±0,08	0,31±0,08	0,29±0,01	0,33±0,01	0,38±0,05 ^d
Lignocérico	C24:0	0,88±0,18	1,10±0,16	1,00±0,20	1,07±0,15	0,52±0,19 ^c
Eicosenoico	C20:1n9	0,21±0,07	0,37±0,05 ^e	0,082±0,01 ^f	0,61±0,09 ^g	0,21±0,08
Nervônico	C24:1n9	0,16±0,08	0,57±0,18 ^e	0,30±0,08 ^a	0,053±0,01 ^h	0,23±0,12
γ- Linoléico	C18:3n6	0,46±0,10	0,45±0,08	0,72±0,05 ⁱ	0,44±0,06	0,088±0,03 ^c
Eicosadienóico	C20:2n6	0,027±0,008	0,43±0,05 ^j	0,37±0,02 ^g	0,59±0,04 ^k	0,21±0,05 ^a
Di-homo-linolênico	C20:3n6	0,29±0,14	0,33±0,04	0,17±0,01 ⁱ	0,37±0,08	0,054±0,02 ^c
Eicosatrienóico	C20:3n3	0,68±0,34	0,74±0,06	0,45±0,06 ^l	0,95±0,25 ^h	0,58±0,06

Resultados expressos em média ± DP. ^ap<0,001 vs Controle. ^bp<0,001 vs Controle e p<0,05 vs HL⁺GA. ^cp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺TCM. ^dp<0,01 vs Controle e HL⁺OS. ^ep<0,001 vs Controle, HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^fp<0,001 vs Controle, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^gp<0,01 vs Controle, HL⁺OP. ^hp<0,001 vs HL⁺OS e p<0,01 vs HL⁺OP. ⁱp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺TCM e HL⁺OP. ^jp<0,001 vs Controle, HL⁺OS e HL⁺OP. ^kp<0,001 vs Controle, HL⁺GA, HL⁺OS e HL⁺OP. ^lp<0,05 vs HL⁺GA. Controle: Dieta Controle AIN-93. HL⁺GA: Dieta hiperlipídica com 50% de gordura animal. HL⁺OS, HL⁺TCM e HL⁺OP: Dieta hiperlipídica com 35% de gordura animal e 15% de óleo de soja, óleo de TCM e óleo de peixe, respectivamente.

Anexo

Anexo 1 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 012/2009, sobre o projeto intitulado “*Avaliação de dietas hiperlipídicas com diferentes composições em ácidos graxos no desenvolvimento da esteatohepatite não alcoólica*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Alceu Afonso Jordão Júnior** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **08 de junho de 2009**.

(We certify that the protocol nº 012/2009, about “*Evaluation of high fat diet with different compositions in fatty acids in the development of nonalcoholic steatohepatitis*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in 06/08/2009 meeting.

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal