Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Metabolismo

**Efeito do óleo de milho no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos
alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose**

Raissa Yolanda de Oliveira Silva

Ribeirão Preto
2021

Raissa Yolanda de Oliveira Silva

**Efeito do óleo de milho no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos
alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose**

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

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior

Ribeirão Preto

2021

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Raissa Yolanda de Oliveira

Efeito do óleo de milho no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose / Raissa Yolanda de Oliveira Silva. Ribeirão Preto, 2021.

63 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior.

Dissertação – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Óleo de milho. 2. Estresse oxidativo. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Frutose

Raissa Yolanda de Oliveira Silva

Efeito do óleo de milho no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose

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

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, que é meu guia, e ao meu pai Joaquim e a minha mãe Jeuvânia, que são meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças durante essa trajetória, e me fazer entender cada ensinamento dessa caminhada chamada vida. Agradeço também aos meus pais, que nunca mediram esforços e estiverem sempre me apoiando em cada decisão, e a minha irmã, por dividir essa vida comigo. Agradeço ao meu namorado, por toda paciência e companheirismo durante essa trajetória.

Agradeço também ao meu orientador, pela oportunidade, por me ajudar nos momentos que precisei e por todo ensinamento compartilhado. Aos colegas de laboratório que me ajudaram durante todo o do experimento.

Agradeço em especial a minha amiga Isabella, minha companheira de mestrado, que esteve ao meu lado durante esses anos, dividindo todos os momentos bons e os ruins, sendo amiga presente, mesmo quando longe. Agradeço também de coração a Paula e ao Héric, um casal maravilhoso, no qual pude aprender e conviver, que sempre me ajudaram e ensinaram, uma troca maravilhosa, são pessoas que levarei para vida.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que me ajudaram, incentivaram e torceram pela minha conquista, levo cada um no meu coração. Agradeço também aos meus familiares mais próximos, que estiveram por perto vibrando cada conquista.

Agradeço a cada um que passou por mim durante todo esse tempo e de alguma forma, boa ou ruim, me ajudou a evoluir!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida a pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, Raissa Yolanda de Oliveira. **Efeito do óleo de milho no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é o acúmulo de gordura nos hepatócitos, e seu desenvolvimento e progressão são causados por fatores ambientais e genéticos, sendo a dieta alimentar um papel fundamental. Objetivo: Avaliar o efeito do óleo de milho nos marcadores de estresse oxidativo e no metabolismo lipídico, em modelo animal utilizando dieta rica em gordura e frutose. Métodos: Os animais foram randomizados em grupos de 12 animais, sendo: Grupo controle: 7% de óleo de soja (CTS); Grupo controle: 7% de óleo de milho (CTM); Grupo hiperlipídico: 50% de banha + frutose (HLF); Grupo hiperlipídico: 25% de banha de porco + 25% de óleo de milho + frutose (HLF/M). Resultados: Os grupos apresentaram menor peso final e ganho de peso quando comparados ao HLF. O peso do fígado diferiu apenas entre CTM e HLF. Em relação a gordura epididimal e retroperitoneal e gordura total, o maior peso foi observado no grupo HLF com diferença significativa entre os controles e HLF/M. Em geral, a relação peso/peso gordura, o maior valor foi observado no grupo HLF. Os resultados das aminotransferases não foram estatisticamente diferentes. Para o perfil lipídico sérico, apenas o colesterol total e o HDL apresentaram diferença estatística, onde os maiores valores foram observados nos grupos que receberam dietas com alto teor de gordura. Os valores de glicemia não apresentaram diferenças, e a relação TRI/HDL, apresentou entre todos os grupos com o grupo CTM. Em relação ao perfil lipídico hepático, os valores de gordura total e triglicerídeos foram significativos entre os grupos controle e os hiperlipídicos, sendo que os maiores valores de colesterol total foram observados nos grupos controle. Os marcadores de estresse oxidativo não apresentaram diferença significativa, além disso, apenas DPPH e GPx apresentaram diferença estatística na capacidade antioxidante. O grupo HLF apresentou o maior percentual de gotículas de gordura, por outro lado, o grupo CTM apresentou a pior análise histológica do fígado, com presença de esteatose, inflamação e balonamento. Conclusão: A modulação da dieta com óleo de milho não resultou em mudanças favoráveis, mas em maiores quantidades associadas a uma dieta hiperlipídica e frutose, houve ação positiva, mesmo que parcial, na esteatose hepática.

Palavras-chave: Óleo de milho; Estresse oxidativo; Dieta hiperlipídica; Frutose

ABSTRACT

SILVA, Raissa Yolanda de Oliveira. **Effect of corn oil on lipid metabolism and oxidative stress in mice fed a high-fat, fructose-rich diet.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the accumulation of fat in hepatocytes, and its development and progression are caused by environmental and genetic factors, with the diet playing a fundamental role. Objective: Evaluate corn oil in the lipid modulation of the diet, in the markers of oxidative stress and lipid metabolism, an animal model using a high-fat, fructose-rich diet. Methods: The animals were randomized into groups of 12 animals, being: Control group: 7% soy oil (CTS); Control group: 7% corn oil (CTM); Hyperlipidic group: 50% lard + fructose (HLF); Hyperlipidic group: 25% lard + 25% corn oil + fructose (HLF/M). Results: The groups had lower final weight and weight gain when compared to HLF. The weight of the liver only differed between CTM and HLF. Regarding the epididymal and retroperitoneal fat and total fat, the highest weight was observed in the HLF group with a statistically difference between controls and HLF/M. In general, regarding the fat weight/weight ratio, the highest value was observed in the HLF group. The aminotransferases results were not statistically different. Similarly, for the serum lipid profile, only total cholesterol and HDL exhibited statistical difference, where the highest values were observed in the groups that received high-fat diets. Blood glucose values also didn't present differences, except the TRI/HDL ratio, showed between all groups to the CTM group. To the hepatic lipid profile, the values for total fat and triglycerides were statist significant between the control groups and the high-fat ones, and the highest values for total cholesterol were observed in the control groups. The oxidative stress markers showed no significant difference, moreover, only DPPH and GPx presented a statistical difference in the antioxidant capacity. The HLF group exhibited the highest percentage of fat droplets, on the other hand, the CTM group presented the worst histological analysis of the liver, with the presence of steatosis, inflammation and ballooning. Conclusion: Modulating the diet with corn oil did not result in favourable changes, but in greater quantities associated with a high-fat diet and fructose, there was a positive action, even if partial, in liver steatosis.

Keywords: Corn oil; Oxidative stress; high-fat diet; fructose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráficos de peso inicial (g), peso final (g) e ganho de peso (g).....	31
Figura 2 -	Gráficos de peso do fígado, peso gordura epididimal, peso gordura retroperitoneal, e soma das gorduras epididimal e retroperitoneal.....	34
Figura 3 -	Glicemia e Relação TRI/HDL.....	37
Figura 4 -	Histologia hepática (H&E).....	40
Figura 5 -	Gráfico AST (U/mL).....	58
Figura 6 -	Gráfico ALT (U/mL).....	58
Figura 7 -	Gráfico Triglicerídeos Soro (mg/dL).....	59
Figura 8 -	Gráfico HDL Soro (mg/dL).....	59
Figura 9 -	Gráfico VLDL Soro (mg/dL).....	60
Figura 10 -	Gráfico Colesterol Total Hepático (mg/gG).....	60
Figura 11 -	Gráfico FOX (nmol/gPT).....	61
Figura 12 -	Gráfico CAT (μ mol/gPT).....	61
Figura 13 -	Gráfico GSH (μ mol/gPT).....	62
Figura 14 -	Gráfico Vitamina E (μ M).....	62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -	Composição das dietas em g por 100g.....	24
Tabela 2 -	Composição de macronutrientes e calórica das dietas.....	25
Tabela 3 -	Média de consumo diário, ingestão energética diária e TED.....	33
Tabela 4 -	Relações peso pelo peso corporal.....	35
Tabela 5 -	Níveis das aminotransferases.....	35
Tabela 6 -	Perfil lipídico do soro.....	36
Tabela 7 -	Perfil lipídico hepático.....	37
Tabela 8 -	Valores hepáticos dos marcadores do estresse oxidativo.....	38
Tabela 9 -	Valores hepáticos da capacidade antioxidante.....	38
Tabela 10 -	Porcentagem de gotículas lipídicas no fígado.....	39
Tabela 11 -	Tabela de cruzes: esteatose, inflamação e balonamento.....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AGs	Ácidos Graxos
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
AIN – 93	American Institute of Nutrition-93
BHT	Butilhidroxitoluol
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CTM	Controle Milho
CTS	Controle Soja
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DPPH	2,2-difenil-1- picril-hidrazil
DTNB	5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FOX	Peróxido de hidrogênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HLF	Hiperlipídica
HLF/M	Hiperlipídica Milho
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
H&E	Hematoxilina e Eosina
Kcal	Quilocalorias
MDA	Malondialdeído
MUFAs	Ácidos Graxos Monoinsaturados
PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
q.s.p.	quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotação por Minuto
SFAs	Ácidos Graxos Saturados
SM	Síndrome Metabólica

TCA	Ácido Tricloroacético
TRI	Triglicerídeo
TRIS	Hidroximetil Aminometano
TED	Taxa de Eficiência da Dieta
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Frutose, dieta hiperlipídica e DHGNA	18
1.2	Ácidos graxos saturados (SFAs), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e DHGNA	19
1.3	Óleo de milho	20
2.	JUSTIFICATIVA	21
3.	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos.	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Animais e protocolos experimentais	23
4.2	Delineamento experimental	23
4.3	Análise histopatológica	25
4.4	Determinação da glicemia	26
4.5	Determinação das frações lipídicas do soro	26
4.6	Determinação das concentrações séricas das Transaminases Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)	26
4.7	Preparo do tecido para as análises	27
4.8	Determinação de proteína hepática	27
4.9	Determinação da glutathiona reduzida (GSH) hepática	27
4.10	Determinação da atividade do 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH) hepático	27
4.11	Determinação de vitamina E hepática	28
4.12	Determinação de glutathiona peroxidase (GPx) hepática.	28
4.13	Determinação da capacidade antioxidante total (CAT) hepática	29
4.14	Determinação de malondialdeído (MDA) hepático	29
4.15	Determinação do peróxido de hidrogênio (FOX) hepático	30
4.16	Quantificação da gordura hepática total	30
4.17	Determinação do perfil lipídico hepático	31
4.18	Análise estatística	31

5.	RESULTADOS	32
6.	DISCUSSÃO	41
7.	CONCLUSÃO	48
8.	REFERÊNCIAS	49
9.	APÊNDICES	58
	Apêndice A – Figura 5 - Gráfico AST (U/mL)	58
	Apêndice B – Figura 6 - Gráfico ALT (U/mL)	58
	Apêndice C – Figura 7 - Gráfico Triglicerídeos Soro (mg/dL)	59
	Apêndice D – Figura 8 - Gráfico HDL Soro (mg/dL)	59
	Apêndice E – Figura 9 - Gráfico VLDL Soro (mg/dL)	60
	Apêndice F – Figura 10 - Gráfico Colesterol Total Hepático (mg/gG)	60
	Apêndice G – Figura 11 - Gráfico FOX (nmol/gPT)	61
	Apêndice H – Figura 12 - Gráfico CAT (μ mol/gPT)	61
	Apêndice I – Figura 13 - Gráfico GSH (μ mol/gPT)	62
	Apêndice J – Figura 14 - Gráfico Vitamina E (μ M)	62
10.	ANEXOS	63
	Anexo 1 - Comitê de Ética Animal	63

1. INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) foi descrita pela primeira vez em 1980, por Ludwing, et al., e desde então vem sendo estudada. Essa doença corresponde ao excesso de gordura acumulada em, no mínimo, 5% dos hepatócitos e possui uma fisiopatologia complexa, relacionada a comorbidades metabólicas, incluindo diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade, síndrome metabólica (SM) e a adiposidade visceral, além de outros fatores de risco, como por exemplo, idade, obesidade, sexo masculino, resistência à insulina e fatores genéticos (ANTONUCCI et al., 2017; BELLENTANI et al., 2010; DIEHL; DAY, 2017; FESTI et al., 2004; MARCHESINI; RODEN; VETTOR, 2016; SAMJI et al., 2019; TORRES; WILLIAMS; HARRISON, 2012; YOUNOSSI et al., 2016). Trata-se de uma doença tipicamente associada à disfunção metabólica, não sendo então uma doença apenas de obesos (YOUNOSSI et al., 2016). Sendo assim, exercício físico e mudanças na alimentação são importantes para todos os pacientes com DHGNA (DYSON; DAY, 2014).

A DHGNA é a doença hepática mais comum no mundo, com prevalência crescente (SAMJI et al., 2019). A prevalência mundial varia entre 8% e 45% da população (FAZEL et al., 2016), nos quais 20% a 25% dos adultos apresentam DHGNA (YOUNOSSI et al., 2016).

Na população geral a DHGNA e suas possíveis progressões, como a cirrose e o câncer de fígado, têm menor prevalência quando comparado com a esteatose hepática isolada (DIEHL; DAY, 2017). Com o aumento da prevalência da obesidade na população, acredita-se que tanto a ocorrência de DHGNA, quanto de esteato-hepatite não alcoólica aumentem (FAZEL et al., 2016). Já o diabetes mellitus tipo 2 está associado à fibrose e há casos de grande risco em pacientes com DHGNA (KAMARAJAH et al., 2018), onde a prevalência de DHGNA nesses pacientes é de 55,5%, de esteato-hepatite é de 37,2% e 17% apresenta fibrose avançada (YOUNOSSI et al., 2019).

Apesar de a DHGNA afetar grande parte da população, a doença apresenta um bom prognóstico; porém, em uma pequena parcela dos pacientes, principalmente obesos e diabéticos, a esteatose hepática é a principal causa para progressão da DHGNA, podendo evoluir até se tornar cirrose e possível hepatocarcinoma e, dessa forma, a DHGNA é a principal causa de doença hepática crônica, sendo, assim, um problema de saúde pública (ABENAVOLI et al., 2014; ADAMS; ANGULO, 2005; BELLENTANI et al., 2010; DIEHL; DAY, 2017). O potencial para se tornar uma doença mais grave pode acabar levando a uma

condição onde apenas o transplante de fígado seja a opção de tratamento possível (SAMJI et al., 2019).

O grau de infiltração de gordura é classificado como leve (1) quando apresenta entre 10 a 30% dos hepatócitos afetados, moderado (2) quando afeta 30 a 70% dos hepatócitos e grave (3) quando há 70% dos hepatócitos afetados (SAADEH et al., 2002). A Associação Americana de Doenças Hepáticas classifica a esteatose hepáticas não alcoólica através das características histológicas em 4 classes, sendo a classe 1 a esteatose simples, a classe 2 esteatose com inflamação lobular, a classe 3 esteatose com presença de hepatócitos balonizados ou classe 4 a esteatose com presença de corpúsculos de mallory ou fibrose (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003).

A alimentação é considerada um potencial fator de risco para essa doença, porém o papel da dieta ainda não é claro, acredita-se que os fatores genéticos e dietéticos interajam, levando ao acúmulo de gordura hepática e, conseqüentemente, façam com que a doença progrida para a injúria celular (ABENAVOLI et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2015). A dieta ocidental leva à obesidade, dislipidemia e ao desenvolvimento das principais características da esteatohepatite não alcoólica, entre elas estresse oxidativo, inflamação, esteatose hepática e fibrose (GARCIA-JARAMILLO et al., 2019).

Existem fatores endógenos, como por exemplo, a lipogênese hepática *de novo* através de precursores não lipídicos, e também fatores exógenos, como consumo excessivo de carboidrato e gordura, contribuindo para o desenvolvimento da DHGNA (ANTONUCCI et al., 2017). A lipogênese hepática *de novo* é importante para o desenvolvimento da DHGNA, e o metabolismo da frutose está relacionado a esse mecanismo (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). O estresse oxidativo parece ser um mecanismo importante que leva à lesão hepática, tendo um papel importante na DHGNA (ANTONUCCI et al., 2017).

Day e James (1998), propuseram a hipótese de dois *hits*, que é a mais aceita para explicar o mecanismo da fisiopatologia: o primeiro *hit*, se caracteriza pelo desequilíbrio entre a formação e *turnover* de triacilglicerídeos, causando a esteatose, pois acredita-se que a resistência à insulina também tem efeito sobre o primeiro *hit*. Já no segundo *hit*, está envolvido ao estresse oxidativo e produção de citocinas inflamatórias causando a injúria hepática e levando à progressão da DHGNA para esteato-hepatite não alcoólica.

Porém a patogênese e progressão da DHGNA é complexa, não podendo ser explicada completamente pela hipótese dos dois *hits* (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). O conceito de múltiplos *hits* descrevem que além do papel do fígado, outros tecidos e células

não hepáticas podem interferir na progressão da doença (YAN et al., 2020). Existem fatores que influenciam tanto na patogênese, quanto na progressão da DHGNA, destacando-se: metabolismo lipídicos desregulado, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo, função imune alterada, disfunção mitocondrial e desequilíbrio da microbiota intestinal que agem juntos com a genética (RAZA et al., 2019).

Para diagnóstico da DHGNA são necessários alguns critérios, como: comprovação de esteatose por histologia ou imagem, paciente não apresentar consumo excessivo de álcool, não haverem outras causas para esteatose hepática, como por exemplo, medicamentos, hepatite C, nutrição parenteral, desnutrição severa e doença de Wilson ou outras causas de doença hepática crônica. A biópsia hepática é considerada o melhor método para diagnóstico, porém apresenta algumas limitações associados a erro amostral, morbidade e mortalidade, além de apresentar alto custo e ser invasivo (CHALASANI et al., 2012).

A medição de rigidez do fígado é considerada tão boa quanto a biópsia hepática para diagnóstico (KAMARAJAH et al., 2018). Contudo, por possuir uma grande variação nas formas de apresentação da doença, o diagnóstico é mais complicado, e pode levar uma subestimação da ocorrência real da doença (SAMJI et al., 2019). A ultrassonografia e a ressonância magnética computadorizada, além dos níveis séricos das aminotransferases podem ser utilizados para identificar a DHGNA, porém, apesar da eficácia desses métodos, somente a biópsia pode confirmar o quadro de doença hepática (CHALASANI et al., 2012; GUNN; SHIFFMAN, 2018).

Não há terapia medicamentosa “padrão ouro”, portanto, entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mesma pode ajudar na criação de novos diagnósticos e abordagens terapêuticas (BELLENTANI et al., 2010; FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017). Estudos mostram que, quando há perda de peso associada a atividade física e dieta equilibrada em pacientes com DHGNA, há melhora na esteatose, na histologia hepática e diminuição das aminotransferases (EL-AGROUDY et al., 2019; TORRES et al., 2019). Dessa forma, é necessário que haja mudança no estilo de vida, visando a perda de peso e a melhora da sensibilidade à insulina (FESTI et al., 2004; MUNDI et al., 2020).

Uma vez que a inflamação, a resistência à insulina e o estresse oxidativo estão relacionados com a patogênese da doença, a suplementação dietética pode ser importante para o tratamento (ESLAMPARAST et al., 2015). Os compostos bioativos presentes nos alimentos estão envolvidos na regulação da expressão e atividade de proteínas relacionadas a

homeostase e metabolismo lipídico, sendo uma nova abordagem para DHGNA (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017)

A educação em saúde é importante, visando a melhora dos hábitos inadequados, para diminuir os riscos de DHGNA (LIN et al., 2018), pois a incidência pode estar aumentando em países ocidentais justamente por conta dos hábitos de vida (BELLENTANI et al., 2010).

1.1. Frutose, dieta hiperlipídica e DHGNA

O comportamento alimentar e estilo de vida prejudiciais são causas da DHGNA, que se tornou a principal causa de doenças hepáticas nos países ocidentais (DONGIOVANNI et al., 2016). Os açúcares simples (frutose/sacarose) induzem a esteatose hepática mais do que os carboidratos complexos (SIDDIQUI et al., 2015). A ingestão dietética, a lipogênese hepática *de novo* e a lipólise dos adipócitos contribuem para DHGNA (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A dieta ocidental tem relação com uma alta ingestão de carboidrato e gorduras, além de ser pobre em polifenóis, e, como consequência, tem-se o possível desenvolvimento da DHGNA (ANTONUCCI et al., 2017).

No último século o consumo de frutose aumentou, e esse aumento tem sido associado a doença hepática gordurosa, obesidade e resistência à insulina (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016). A frutose é muito encontrada na dieta ocidental, que induz a lipogênese e leva à resistência à insulina, reduz beta-oxidação dos ácidos graxos, levando a um estresse oxidativo e consequentemente a progressão da DHGNA (ANTONUCCI et al., 2017; JENSEN et al., 2018; SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

O metabolismo da frutose pela frutoquinase gera uma queda no ATP com renovação de nucleotídeos e também a geração de ácido úrico, que possui um efeito pró-oxidante e pró-inflamatório, e esses efeitos acarretam no aumento na permeabilidade intestinal e endotoxemia, que acabam exacerbando o processo lipogênico no fígado que, associado a uma disfunção mitocondrial, leva ao surgimento da DHGNA (JENSEN et al., 2018). Sendo assim, a frutose tem sido relacionada a progressão da doença, e evitá-la leva a uma melhora na DHGNA (SOFTIC; COHEN; KAHN, 2016).

A dieta hipercalórica oferece uma alta quantidade de gordura e açúcar, que acabam saturando a capacidade do fígado em exportar triglicerídeos, o que acaba levando ao acúmulo nos hepatócitos e ao aumento nos níveis séricos de triglicerídeos e glicose (COSTA et al., 2019). Pessoas que recebem dieta com alto percentual de gordura, de aproximadamente 60%,

apresentam uma maior expressão gênica pro-inflamatória, quando comparado com uma dieta com baixo percentual de gordura, de aproximadamente 10% (CHAN et al., 2015).

Uma vez que o método mais comum usado para induzir DHGA é modificando a dieta quanto ao tipo e quantidade de gordura, colesterol e carboidrato, e estes fatores dietéticos desempenham um papel importante na DHGNA humana, os modelos animais são importantes para testar hipóteses, tanto sobre a indução quanto a progressão da doença (ARISQUETA et al., 2018; RIORDAN; NADEAU, 2014). Em estudo realizado por Dowman et al. (2014), verificou-se que, na ausência de toxinas e variação genética, a dieta rica em frutose e hiperlipídica são capazes de induzir esteato-hepatite não alcoólica em modelo animal. Porém em estudo realizado por Esteves et al. (2020), ao oferecer frutose através da água houve um aumento no peso, na adiposidade e também nos triglicerídeos séricos, porém sem levar a lesão hepática ou esteatose.

1.2. Ácidos graxos saturados (SFAs), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e DHGNA

O fígado é o órgão principal no metabolismo de ácidos graxos e triglicerídeos, e quando as vias metabólicas se encontram alteradas, pode levar a DHGNA (ALVES-BEZERRA; COHEN, 2018). O efeito danoso relacionado ao alto teor de gordura parece estar relacionado aos ácidos graxos saturados (SFAs), enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) presentes na dieta podem ser benéficos (YKI-JÄRVINEN, 2015). Sendo assim, uma dieta com carboidrato moderado a baixo, com maior quantidade de MUFAs e PUFAs, e reduzida em SFA podem beneficiar pacientes com DHGNA (RUSU et al., 2015).

SFAs são difíceis de serem evitados nas dietas atuais (WANG et al., 2017), e dietas hiperlipídicas, onde SFAs predominam, acabam influenciando danos na permeabilidade intestinal, que leva a um estímulo maior à produção de endotoxinas, gerando um processo inflamatório maior (FIGUEIREDO et al., 2017).

PUFAs parecem ter um efeito positivo para algumas comorbidades relacionadas à obesidade, como por exemplo, diminuindo resistência à insulina, dislipidemias e também marcadores inflamatórios e DHGNA (FIGUEIREDO et al., 2017).

1.3. Óleo de milho

O óleo de milho é recomendado para substituir gorduras saturadas, devido ao seu nível elevado de ácidos graxos mono e poli-insaturados (SI et al., 2014), composto por aproximadamente 55% de ácido linoleico (RICHARDSON et al., 2017). Houve um aumento nos últimos tempos no consumo do mesmo, porém uma alta quantidade de óleo de milho na dieta ocidental está relacionada a graves alterações histomorfológicas no tecido adiposo epididimal, apresentando então risco de gerar alterações metabólicas (DRESCHER et al., 2019; HAGGAG; ELSANHOTY; RAMADAN, 2014).

O óleo de milho também é utilizado para melhorar a palatabilidade de produtos na indústria alimentícia (AL-SHAAIBI et al., 2016). Em estudo realizado por Cui et al. (2017), o óleo de milho apresentou maior valor de gordura trans durante o processo de fritura, sendo que o tempo ótimo de fritura foi de 6 horas.

Ao oferecer uma dieta ocidental, com 40% de óleo de milho, 20% de frutose e 2% de colesterol, os resultados se apresentam parecidos com a dieta ocidental padrão, levando a um desenvolvimento e progressão de lesão hepática crônica, induzida pela dieta, após 24 semanas (DRESCHER et al., 2019).

Estudo mostrou que a relação entre ácido linoleico/ácido oleico do fígado se apresentou significativamente maior nos camundongos alimentados com óleo de milho, quando comparados com óleo de oliva, conforme o esperado (SAÍN et al., 2013). Outro estudo mostrou que o óleo de milho em ratos idosos apresentou melhora quando observado a patologia hepática (SI et al., 2014). O óleo de milho tem sido associado também ao aumento significativo da peroxidação lipídica, além de aumentar os níveis de malondialdeído (MDA) no fígado e no sangue (HAGGAG; ELSANHOTY; RAMADAN, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos atuais vêm mostrando cada vez mais que o consumo excessivo de alimentos industrializados, que são ricos em gorduras saturadas e frutose, estão relacionados ao desenvolvimento de doenças hepáticas, em especial a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que tem forte associação com a obesidade e suas comorbidades como hipertensão arterial, dislipidemias, resistência à insulina e diabetes mellitus, levando ao estresse oxidativo. Todos esses fatores têm despertado grande atenção nas políticas públicas de saúde e também na pesquisa.

Deve-se considerar terapias voltadas à redução ou até mesmo à prevenção, diminuindo o dano hepático, e conseqüentemente melhorando a função hepática, visando retardar então a progressão da doença e até mesmo diminuindo os efeitos do estresse oxidativo.

O consumo de óleo de milho aumentou nos últimos tempos, sendo visto como uma opção de óleo de melhor qualidade, contudo não se sabe ainda até que ponto realmente o óleo de milho traz benefícios à saúde, principalmente para pacientes com maiores chances de desenvolver ou que já estejam em tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica.

Devido à dificuldade para diagnóstico da DHGNA, uma melhor análise pode ser realizada por estudos experimentais, incluindo a histopatológica para determinar o grau de morfologia da patogênese, quantificação de proteína e ácidos graxos tanto séricos quanto hepáticos, glicemia, determinação das frações lipídicas, peroxidação lipídica, e determinação do estresse oxidativo e atividade antioxidante. Dessa forma pode-se investigar quais efeitos a modulação da dieta acarreta.

Portanto o presente estudo tem por objetivo testar o efeito do óleo de milho, mediante modulação lipídica da dieta, nos marcadores do estresse oxidativo e metabolismo lipídico hepático e sérico em modelo animal utilizando dieta hiperlipídica e rica em frutose.

Com os resultados, espera-se contribuir para melhorias nas orientações dietéticas para prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica ou até mesmo como terapia auxiliar ao seu tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar o efeito do óleo de milho nos marcadores do estresse oxidativo e metabolismo lipídico hepático e sérico em modelo animal utilizando dieta hiperlipídica e rica em frutose.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar ganho de peso e ingestão alimentar diária;
- Avaliar o estresse oxidativo hepático nos animais;
- Avaliar morfológicamente a esteatose hepática, inflamação e balonamento;
- Avaliar níveis séricos de glicemia e aminotransferases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e protocolos experimentais

O trabalho foi submetido para aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), e aprovado sob protocolo nº 129/2018 (Anexo 1). O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Ciências da Saúde da FMRP-USP.

Foram utilizados 48 camundongos machos C57/BL6 com peso inicial de aproximadamente 20g, mantidos em alojamento climatizado no biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, com livre acesso a água e ração, submetidos ao ciclo de 12 horas de luz/sombra e temperatura mantida a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o delineamento experimental.

Todos os animais foram manuseados de acordo com as recomendações do “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” preparado pela “National Academy of Sciences” e publicado pela “National Institutes of Health” (NIH publication 86-23 revised 1985).

4.2. Delineamento experimental

Os animais foram alimentados com dieta para roedores em fase de crescimento recomendada pela “American Institute of Nutrition” (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), sendo uma dieta padrão/controle, e em cada um dos grupos foi modificado conforme o grupo experimental.

Os grupos experimentais e seus respectivos números de animais em cada grupo são:

- 1. Grupo controle (CTS, n=12):** Dieta AIN – 93 com 7% de óleo de soja
- 2. Grupo controle (CTM, n=12):** Dieta AIN – 93 com 7% de óleo de milho
- 3. Grupo hiperlipídica + frutose (HLF, n=12):** Dieta com 50% de gordura saturada (banha de porco) e 20% de Frutose;

4. Grupo hiperlipídica + frutose + óleo de milho (HLF/M, n=12): Dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) + 25% de óleo de milho e 20% de Frutose.

Para os grupos que receberam dietas hiperlipídicas, o amido e a sacarose foram substituídos pela frutose, num total de 20%. Além disso, o grupo HLF recebeu 50% de gordura saturada (banha de porco), e para o grupo HLF/M a dieta conteve 25% de gordura saturada (banha de porco) e 25% de óleo de milho, como pode ser observado na Tabela 1 abaixo, a composição das dietas. A banha e os óleos foram adquiridos comercialmente na cidade de Ribeirão Preto/SP. O óleo de soja e o óleo de milho comprados foram da marca Liza®.

Tabela 1 – Composição das dietas por 100g

Ingredientes	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Caseína (g)	20	20	20	20
Amido (g)	52,9	52,9	0	0
Sacarose (g)	10	10	0	0
Frutose (g)	0	0	20,25	20,25
Banha (g)	0	0	50	25
Óleo de soja (g)	7	0	0	0
Óleo de milho (g)	0	7	0	25
Fibra (g)	5	5	5	5
Mix Vitaminas (g)	1	1	1	1
Mix Minerais (g)	3,5	3,5	3,5	3,5
L- Cisteína (g)	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina (g)	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT (mg)	1,4	1,4	1,4	1,4

BHT= Butilhidroxitoluol; CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 2 podemos observar a composição das dietas e suas diferenças quanto aos macronutrientes e quantidade de calorias, onde os grupos controles receberam uma dieta com menor quantidade de calorias, enquanto os grupos hiperlipídicas receberam dietas com maior quantidade de calorias.

Tabela 2 – Composição de macronutrientes e calórica das dietas

Macronutrientes	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Carboidratos (%)	62,9	62,9	20,25	20,25
Proteínas (%)	20	20	20	20
Lipídios (%)	7	7	50	50
Kcal/100g	394,6	394,6	611	611
Kcal/g	3,9	3,9	6,1	6,1

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Os animais foram aleatorizados em caixas com 2 animais cada. As dietas foram preparadas semanalmente, ou conforme necessidade. No início do estudo houve um período de adaptação às dietas hiperlipídicas, as quais foram preparadas na proporção de 1:1 (experimental:controle) e posteriormente na proporção de 2:1 durante sete dias.

Três vezes na semana foi aferida a quantidade consumida da dieta, e em seguida a dieta foi repostada, deixando disponível a quantidade suficiente de consumo, com uma margem de segurança. Baseada nessa quantidade, foi feita a média do consumo diário. A ingestão energética foi calculada a partir da dieta ofertada. Foi calculada a taxa de eficiência da dieta (TED), que expressa a eficiência da dieta para proporcionar o ganho de peso, utilizando a fórmula (KANG; AHN; LEE, 2005):

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

Os animais também foram pesados três vezes na semana durante todo o experimento. Após as 16 semanas, os animais foram eutanasiados. O sangue foi coletado e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos, para haver completa coagulação, e em seguida realizada centrifugação em centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R a 3500 rotações por minuto (r.p.m.) à 4°C por 10 minutos para a separação e retirada do soro. O fígado, tecido adiposo epididimal e retroperitonal foram retirados e pesados em balança de precisão Shimadzu AY220. Os fragmentos de fígado foram coletados para análise histológica, já os outros tecidos, assim como o restante do fígado, foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

4.3. Análise histopatológica

Os fragmentos de fígado foram coletados e imediatamente imersos em frasco contendo formalina (10% em solução tamponada), por 16 horas. Após esse período, os tecidos

passaram por um processo de desidratação, com banhos de álcoois em concentrações crescentes (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) a cada 1 hora, seguidos por diafanização em banhos de xilol. Os tecidos foram incluídos em parafina e posteriormente obtidos cortes de 5µm no micrótomo. As lâminas foram coradas utilizando Hematoxilina e Eosina (H&E). As imagens histológicas foram capturadas em aumento de 20x pelo microscópio Olympus BX61VS. A porcentagem total da área de gotículas lipídicas foi avaliada utilizando-se o software Fiji (ImageJ). Para a quantificação das gotículas, as imagens foram convertidas para um modo binário (8-bit) e um threshold foi ajustado para o destaque das gotículas lipídicas, seguido da quantificação da área correspondente. A área total de gotículas foi apresentada em porcentagem da área total ocupada pelo fígado. Foram avaliados, além da presença de esteatose, a inflamação e balonamento, classificadas em ausente, baixa, moderada, alto e severo, conforme (KLEINER et al., 2005).

4.4. Determinação da glicemia

A glicemia dos animais foi aferida ao final do experimento, utilizando-se glicosímetro Accu-Chek Active, e os valores foram anotados para análise.

4.5. Determinação das frações lipídicas do soro

No soro foram dosados o colesterol total, o colesterol presente na lipoproteína HDL (lipoproteína de alta densidade) e os triglicerídeos, utilizando kits comerciais da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). A partir do resultado dos triglicerídeos, foi estimado o valor da lipoproteína de muito baixa intensidade (VLDL). As análises, foram realizadas por espectrofotômetro Epoch – BioTek. A razão triglicerídeos/HDL colesterol foi calculada como preditor da resistência à insulina, conforme proposto por Fan et al. (2011).

4.6. Determinação das concentrações séricas das Transaminases Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

AST e ALT foram determinadas em soro por meio de Kit comercial da marca Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), por reação colorimétrica e leitura por espectrofotômetro Epoch – BioTek.

4.7. Preparo do tecido para as análises

Foi pesado aproximadamente 100mg de tecido, e anotado todos os pesos para posteriores correções, e armazenado em eppendorf de 2mL em congelador de -80°C. Antes da análise foi acrescentado 100µL da solução tampão (Na_2HPO_4 – fosfato de sódio) e homogenizado com micro homogeneizador MA1102 da marca Marconi, após foi adicionado solução tampão até atingir 500µL. Assim foi possível saber quantos gramas de tecidos tinha por mL. Após foi centrifugado a 3500 r.p.m. por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e pipetado para cada análise que foi realizada posteriormente, o restante do sobrenadante foi armazenado em um eppendorf.

4.8. Determinação de proteína hepática

A determinação da proteína hepática foi realizada de acordo com kit comercial, pelo método de Biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), e feita a leitura em espectrofotômetro Epoch – BioTek. Para o teste foi utilizado o homogenato de fígado.

4.9. Determinação da glutathiona reduzida (GSH) hepática

A dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) foi realizada no tecido hepático a partir do método descrito por Sedlak; Lindsay (1968), com algumas adaptações. Uma alíquota de 25µL do homogenato foi retirada, e misturada a 200µL de água deionizada e 50µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% e 500µL EDTA. Logo após foi agitado em vortex AP 59 – Phoenix Luferco, esperou 15 minutos e agitou novamente, em seguida a amostra foi centrifugada por 15 minutos (4000 r.p.m. a temperatura ambiente). Após a centrifugação, 250µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e, a esse material, foram adicionados 250µL de tampão TRIS (0,4M, pH 8,9) e 25µL de DTNB (ácido ditionitrobenzóico) (0,01M em metanol). A solução foi homogeneizada e, após 5 minutos, a leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 412nm em espectrofotômetro Epoch – BioTek. A concentração foi calculada utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02M) contra um branco composto por EDTA, TRIS e DTNB.

4.10. Determinação da atividade do 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH) hepático

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSSET, 1995) é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Esse método foi modificado por Sánchez-Moreno; Larrauri; Saura-Calixto (1998). A

solução de DPPH foi preparada dissolvendo 2,4mg do DPPH em álcool metílico e completado o volume até atingir 100mL. Em microtubos foram adicionados 10µL do homogenato e 390µL da solução de DPPH, o material foi agitado em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco, e deixado em ambiente escuro por 30 minutos, sendo agitado a cada 15 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 3500 r.p.m. em temperatura ambiente, por 5 minutos, e a leitura do sobrenadante foi realizada a 515nm em espectrofotômetro Epoch – BioTek.

4.11. Determinação de vitamina E hepática

As análises hepáticas de vitamina E (alfa-tocoferol) foram realizadas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), segundo método adaptado de Arnaud et al. (1991). Em microtubos de 2mL, cerca de 100mg de tecido foram homogeneizados em 0,5mL de etanol; em seguida foi adicionado 0,5mL de hexano e a mistura foi agitada em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco por 1 minuto, e centrifugada a 3500 r.p.m. durante 5 minutos, em centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R. Após a centrifugação, 100µL da fase hexânica (sobrenadante) foram transferidos para outro microtubo, onde foi realizada a secagem com fluxo de nitrogênio para que ficasse no microtubo apenas a parte lipídica do material. A esses microtubos foram adicionados 100µL da fase móvel (70% acetonitrila, 20% diclorometano e 10% metanol) e, para ressuspender a gordura, os microtubos foram agitados. Em seguida, todo o material foi transferido para o *vial* e lido em HPLC Shimadzu modelo LC-20AT, coluna tipo C-18 (250 x 4,6 mm – 5µm), detector UV-visível modelo SPD-20A.

4.12. Determinação de glutathiona peroxidase (GPx) hepática

Para determinar GPx, foi realizada uma adaptação do método proposto por Paglia; Valentine (1967). Em cubeta de 4mL foi adicionado 1,8mL de tampão, 6,7µL de azida de sódio, e colocado em espectrofotômetro SpectraMax M3 – Molecular Devices a 37°C por 30 segundos. A esse material ainda a 37°C, foram adicionados 67µL de GSH, 67µL de NADPH, 2µL de glutathiona redutase e 67µL de amostra. A reação foi iniciada com a adição de 67µL de H₂O₂. Foi feita a leitura com a absorbância de 340nm a cada 30 segundos, por 2 minutos para avaliar linearidade da reação.

Para calcular a concentração de GPx, subtraiu-se o valor da última leitura (2 minutos) do valor da primeira leitura (assim que colocou o H₂O₂).

4.13. Determinação da capacidade antioxidante total (CAT) hepática

Para determinar a Capacidade Antioxidante Total, foi utilizado a metodologia proposta por Erel, 2004 e adaptada. Foram preparadas duas soluções:

Solução A, composta por 940mL de solução tampão de acetato 0,4mol/L (obtida com a diluição de 32,8g de CH_3COONa em água deionizada em quantidade suficiente para (q.s.p.) 1000mL) e 60mL de ácido acético (22,8mL de ácido acético glacial de grau reagente foi diluído em água deionizada em q.s.p.1000mL), com pH final 5.8.

Solução B, preparada misturando 75mL de solução tampão de acetato de sódio 30mmol/L (2,46g de CH_3COONa diluído em água deionizada em q.s.p. 1000mL) a 925mL de ácido acético glacial de grau reagente (1,705mL foi diluído em água deionizada em q.s.p. 1000mL. Foi acertado o pH para 3.6. Após o preparo dessa solução, foram acrescentados 278 μL de solução comercial de H_2O_2 (35%), com concentração final de 2 mmol/L. Em seguida foram separados 100mL dessa solução e a esses foram acrescentados 0,549g de ABTS (concentração final de 10 mmol/L) e, após uma hora de incubação em temperatura ambiente, a cor característica dessa solução apareceu.

A análise foi realizada adicionando-se 5 μL de amostra diretamente na placa, em seguida foram acrescentados 200 μL da solução A e foi realizada a leitura com a absorbância de 660nm em espectrofotômetro Epoch – BioTek, para ter o branco da própria amostra; após a primeira leitura, foi adicionado 20 μL da segunda solução, esperou 5 minutos cronometrados e foi realizada uma segunda leitura. Para curva foi utilizado solução de trolox.

4.14. Determinação de malondialdeído (MDA) hepático

A análise de MDA hepático foi realizada de acordo com Gérard-Monnier et al. (1998), com algumas adaptações. Em um microtubo foram colocados 100 μL do homogenato do tecido e 300 μL de solução de 1-metil-fenilindol à concentração de 10mM em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e agitado em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco. Em seguida foram adicionados 75 μL de HCl fumegante (37%) e agitado novamente em vórtex. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 45°C por 40 minutos, e em seguida centrifugadas a 4000 r.p.m. a 4°C por 5 minutos. A leitura de absorbância do sobrenadante foi realizada em equipamento Epoch – BioTek, a um comprimento de onda de 586nm, e a concentração de MDA foi calculada comparando-a a uma curva padrão de MDA.

4.15. Determinação do peróxido de hidrogênio (FOX) hepático

Foi realizada de acordo com a metodologia de Södergen et al., 1998. A princípio foram preparadas duas soluções: a primeira composta por 7,6mg de xilenol e 88mg de BHT diluídos em 90mL de metanol; e a segunda contendo 9,8mg de sulfato ferroso em 10mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 250mM (0,13mL de H_2SO_4 em 9,87mL de água). As duas soluções foram misturadas na proporção de 9:1 em um béquer, e 1mL dessa solução foi adicionado a microtubos de 1,5mL (fundo cônico) contendo 100 μL do homogenato de fígado. O material foi agitado em vórtex AP 59 – Phoenix Luferco e incubado por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, sendo agitado a cada 15 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado por 5 minutos a 4000 r.p.m. e o sobrenadante lido a 560nm, em espectrofotômetro Epoch – BioTek. Para curva foi utilizado H_2O_2 diluído em série a partir de 200 μM . Para o branco foi adicionado 200 μL da solução preparada, direto na placa.

4.16. Quantificação da gordura hepática total

Foi extraída a gordura total de acordo com o método proposto por Bligh; Dyer (1959), com redução proporcional dos volumes, pois os tecidos hepáticos dos animais não seriam suficientes para realizarmos todas as análises. Foram homogeneizados em tubos de ensaio, com micro homogeneizador Marconi MA1102, 0,250g do tecido hepático em 400 μL de água Milli-Q; a essa solução foram acrescentados 500 μL de clorofórmio e 1mL de metanol e agitados em vórtex (modelo Phoenix Luferco AP59) na velocidade máxima durante 1 minuto. Em seguida foram adicionados 500 μL de água Milli-Q e 500 μL de clorofórmio, e a mistura foi agitada novamente em vórtex durante 2 minutos. As amostras foram centrifugadas em Sorvall Legend Mach 1.6 R por 5 minutos a 4000 r.p.m.. A fase clorofórmica (inferior) foi extraída para um microtubo contendo 250mg de sulfato de sódio anidro, agitadas em vórtex e centrifugadas por 5 minutos a 4000 r.p.m. Sendo assim, obtivemos a fase clorofórmio livre de água, onde 0,5mL da dessa fase foi transferido para um microtubo tipo eppendorf previamente pesado, e posteriormente colocado aberto em estufa a 50°C por 18 horas, para que todo o clorofórmio evaporasse. Então foi realizada nova pesagem dos microtubos, agora contendo a gordura e foram feitos os cálculos de gordura total subtraindo-se o peso dos microtubos com gordura do peso dos mesmos ainda vazios.

4.17. Determinação do perfil lipídico hepático

Para a dosagem de triacilgliceróis e de colesterol total dessas gorduras, ou seja, do perfil lipídico hepático, os microtubos foram ressuspensos em 500 μ L isopropanol, e essa suspensão foi analisada de acordo com kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), as absorvâncias foram medidas por espectrofotômetro Epoch – BioTek.

4.18. Análise estatística

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

5. RESULTADOS

Inicialmente apresentamos os resultados do peso inicial dos animais, onde vemos que só houve diferença estatística entre os grupos controles, onde o grupo CTM apresenta um menor peso inicial. Já em relação ao peso final, todos os grupos apresentaram menor peso final quando comparado ao grupo HLF ($34,58 \pm 4,69$), houve também uma diferença estatística significativa entre os grupos CTM e HLF/M, sendo que o grupo CTM ($27,25 \pm 2,67$) apresenta menor peso final. Em relação ao ganho de peso, todos os grupos apresentam diferença estatística significativa quando comparado ao grupo HLF, sendo que o mesmo apresenta o maior ganho de peso, já os grupos controles (CTS e CTM) também apresentam uma diferença estatística significativa em relação ao grupo HLF/M ($13,25 \pm 4,67$), sendo que os dois apresentam valores menores. Esses dados podem ser observados na Figura 1, onde são observados os gráficos; podemos ver também que o grupo CTM apresenta menor peso final, e menor ganho de peso, e o grupo HLF apresenta tanto maior peso final, quanto maior ganho de peso.

Figura 1 – Gráficos de peso inicial (g), peso final (g) e ganho de peso (g)

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: a= $p < 0,05$ em relação ao CTS; c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d= $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Podemos observar na Tabela 3, os resultados referentes a média de consumo diário, ingestão energética diária e TED. Em relação à média de consumo diário, todos os grupos apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo CTS ($4,23 \pm 0,29$), sendo que o mesmo apresentou maior consumo, já os grupos HLF e HLF/M apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo CTM ($3,85 \pm 0,44$) que apresentou maior consumo quando comparado com os dois. Uma vez que as dietas hiperlipídicas apresentam um maior aporte calórico, é esperado que as mesmas apresentem um menor consumo. O grupo que apresentou um menor consumo, foi o grupo HLF ($2,99 \pm 0,31$).

Mesmo os grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram menores médias de consumo diário, devido ao maior valor calórico por grama de dieta, eles apresentam maiores ingestões energéticas diárias, sendo que o grupo HLF/M ($20,58 \pm 1,51$) foi o que apresentou maior valor, e quando comparado ao demais grupos, houve uma diferença estatística significativa. Houve diferença também entre os grupos CTM e HLF, sendo o grupo CTM ($15,00 \pm 1,73$) foi quem apresentou menor valor.

Já em relação à TED, todos os grupos apresentaram menor valor significativo quando comparado ao grupo HLF ($0,38 \pm 0,09$), sendo que o mesmo, foi quem apresentou maior valor. O grupo HLF/M também apresentou diferença quando comparado aos grupos controles, sendo que CTM ($0,11 \pm 0,03$) foi quem apresentou menor valor.

Tabela 3 – Média de consumo diário, ingestão energética diária e TED

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Média de consumo diário (g)	$4,23 \pm 0,29$	$3,85 \pm 0,44^a$	$2,99 \pm 0,31^{a, b, d}$	$3,37 \pm 0,25^{a, b}$
Ingestão energética diária (kcal/d)	$16,52 \pm 1,14^d$	$15,00 \pm 1,73^{c, d}$	$18,21 \pm 1,91^d$	$20,58 \pm 1,51$
TED (%)	$0,12 \pm 0,02^{c, d}$	$0,11 \pm 0,03^{c, d}$	$0,38 \pm 0,09$	$0,25 \pm 0,09^c$

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: a= $p < 0,05$ em relação ao CTS; b= $p < 0,05$ em relação ao CTM; c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d= $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Figura 2, observamos os pesos e somatórias dos tecidos. Em relação ao peso do fígado, só foi possível observar uma diferença estatística significativa entre os grupos CTM ($0,91 \pm 0,16$) e HLF ($1,16 \pm 0,31$), sendo que os mesmos apresentam respectivamente, menor e maior valor.

Em relação aos pesos das gorduras epididimal e retroperitoneal, e também a soma das mesmas, elas apresentam as mesmas diferenças estatísticas significativas, sendo que todos os grupos apresentam diferença quando comparado ao grupo HLF, que apresenta os maiores valores. Os grupos controles também apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo HLF/M, sendo que em relação ao mesmo apresenta maior valor.

Figura 2 – Gráficos de peso do fígado, peso gordura epididimal, peso gordura retroperitoneal, e soma das gorduras epididimal e retroperitoneal

Valores expressos em média e desvio padrão, onde c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d= $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 4, observamos a relação peso do fígado pelo peso total, não apresentou diferença entre os grupos. Já a relação peso da gordura epididimal pelo peso total em todos os grupos apresentam diferença estatística significativa quando comparado ao grupo HLF (5,49

$\pm 1,19$), sendo que o mesmo apresentou uma maior relação. A relação gordura retroperitoneal pelo peso, só houve diferença estatística significativa quando comparado os grupos controles e grupo HLF, também entre os grupos CTS e HLF/M, sendo que o maior valor foi observado no grupo HLF ($2,03 \pm 0,29$) e o menor no grupo CTS ($0,91 \pm 0,33$). Quanto à relação das somas das gorduras pelo peso, observamos que todos os grupos apresentam diferença estatística significativa quando comparados ao grupo HLF, e que os grupos controles apresentam diferença quando comparado ao grupo HLF/M.

Tabela 4 – Relações peso pelo peso corporal

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Relação peso fígado/peso (%)	$3,19 \pm 0,56$	$3,34 \pm 0,50$	$2,95 \pm 0,41$	$3,24 \pm 0,42$
Relação peso epididimal/peso (%)	$2,33 \pm 0,61^{c, d}$	$2,39 \pm 0,75^{c, d}$	$5,49 \pm 1,19$	$3,78 \pm 1,86^c$
Relação peso retroperitoneal/peso (%)	$0,91 \pm 0,33^{c, d}$	$1,08 \pm 0,57^c$	$2,03 \pm 0,29$	$1,52 \pm 0,81$
Somas das gorduras/peso (%)	$3,24 \pm 0,92^{c, d}$	$3,47 \pm 0,87^{c, d}$	$7,53 \pm 1,43$	$5,30 \pm 2,65^c$

Valores expressos em média e desvio padrão, onde c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d= $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Quando analisados os valores das aminotransferases, na Tabela 5, percebemos que não houve diferença estatística significativa entre eles. É possível perceber que todos os grupos apresentam um desvio padrão muito alto, e, embora não tenha tido diferença estatística significativa, o grupo CTM apresenta maiores valores.

Tabela 5- Níveis das aminotransferases

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
AST (U/mL)	$62,15 \pm 28,86$	$87,48 \pm 57,61$	$58,70 \pm 22,03$	$64,99 \pm 28,76$
ALT (U/mL)	$20,74 \pm 31,40$	$39,42 \pm 56,58$	$39,96 \pm 29,74$	$16,12 \pm 8,47$

Valores expressos em média e desvio padrão. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 6, observamos o perfil lipídico do soro, e nela podemos notar que em relação ao colesterol total, todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao grupo HLF ($157,00 \pm 29,40$), sendo que o mesmo apresentou maior valor. Houve diferença também comparando os grupos controles, CTS e CTM, com o grupo HLF/M, que também apresentou maior valor quando comprado aos dois.

Em relação aos triglicerídeos e VLDL, percebemos que não houve diferença estatística significativa, porém nos dois, o grupo HLF foi quem apresentou maiores valores. Já o HDL teve diferença estatística quando comparado o HLF com os demais grupos, sendo que o mesmo apresentou um maior valor. Houve diferença também entre os grupos CTM e HLF/M, sendo que HLF/M foi quem apresentou um maior valor, e o CTM menor valor.

Tabela 6 – Perfil lipídico do soro

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Colesterol total (mg/dL)	$76,42 \pm 17,94^{c, d}$	$82,32 \pm 34,98^{c, d}$	$157,00 \pm 29,40$	$112,30 \pm 22,44^c$
Triglicerídeos (mg/dL)	$70,50 \pm 17,04$	$80,53 \pm 18,79$	$88,79 \pm 8,63$	$87,47 \pm 21,22$
HDL (mg/dL)	$77,94 \pm 12,74^c$	$66,51 \pm 44,07^{c, d}$	$152,60 \pm 18,30$	$107,9 \pm 25,91^c$
VLDL (mg/dL)	$14,10 \pm 3,41$	$16,11 \pm 3,76$	$17,76 \pm 1,73$	$17,49 \pm 4,24$

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d= $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Figura 3, observamos os gráficos referentes a Glicemia e Relação TRI/HDL. No gráfico de Glicemia observamos que não houve diferença estatística entre os mesmos, porém o grupo CTM ($119,80 \pm 20,22$) foi quem apresentou menor valor. Já no referente a Relação TRI/HDL, verificamos que todos os grupos apresentarem diferença quando comparado ao grupo CTM, sendo que o mesmo apresentou maior valor, mostrando então uma maior resistência à insulina.

Figura 3 – Glicemia e Relação TRI/HDL

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: b= p<0,05 em relação ao CTM. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 7, temos os dados referentes ao perfil lipídico hepático, onde observamos que a gordura total apresenta diferença significativa apenas quando comparamos os grupos controles com os grupos hiperlipídicas, sendo o maior valor observado no grupo HLF ($0,17 \pm 0,03$) e o menor no grupo CTS ($0,09 \pm 0,04$).

Já em relação ao colesterol total, observamos que o grupo CTM, quando comparado os grupos HLF e HLF/M apresenta uma diferença estatística significativa, no qual o mesmo apresenta o maior valor observado, há também uma diferença significativa entre o grupo CTS e HLF/M, o grupo que apresenta o menor valor foi HLF/M ($14,91 \pm 1,99$).

Quanto aos triglicerídeos, houve diferença quando comparados os grupos controles com os grupos hiperlipídicas, onde os controles apresentam menores valores e os hiperlipídicas, valores maiores.

Tabela 7 – Perfil lipídico hepático

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Gordura total (g/gT)	$0,09 \pm 0,04^{c, d}$	$0,10 \pm 0,01^{c, d}$	$0,17 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$
Colesterol total (mg/gG)	$19,34 \pm 5,65$	$21,72 \pm 3,42$	$16,21 \pm 1,68^b$	$14,91 \pm 1,99^{a, b}$
Triglicerídeos (mg/gG)	$123,00 \pm 45,91^{c, d}$	$126,40 \pm 43,48^{c, d}$	$288,00 \pm 44,85$	$298,80 \pm 91,03$

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: a= p<0,05 em relação ao CTS; b= p<0,05 em relação ao CTM; c= p<0,05 em relação ao HLF; d= p<0,05 em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM

= Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Em relação aos valores hepáticos dos marcadores do estresse oxidativo, contidos na Tabela 8, observamos que não há diferença estatística significativa entre os grupos, quando analisado FOX e MDA. Porém o grupo HLF foi quem apresentou maiores valores, indicando um maior valor estresse oxidativo no grupo.

Tabela 8 – Valores hepáticos dos marcadores do estresse oxidativo

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
FOX (nmol/gP)	390,20 ± 78,41	415,10 ± 108,10	454,70 ± 110,55	412,30 ± 171,28
MDA (nmol/gP)	612,10 ± 108,29	586,00 ± 141,49	667,10 ± 298,34	501,20 ± 93,00

Valores expressos em média e desvio padrão. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Ao analisarmos os dados referentes à capacidade antioxidante hepática, presente na Tabela 9, temos os resultados de CAT, DPPH, GPx, GSH e Vitamina E. Quanto ao CAT, GSH e Vitamina E não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Enquanto em DPPH, todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao grupo HLF/M (3,60 ± 0,63), o qual apresenta maior valor. Já em relação ao GPx houve uma diferença entre o grupo CTS e HLF, sendo o menor valor observado no grupo CTS (714,50 ± 220,60).

Tabela 9 - Valores hepáticos da capacidade antioxidante

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
CAT (μmol/gP)	9,58 ± 2,41	10,23 ± 2,87	12,01 ± 3,18	10,08 ± 2,79
DPPH (μmol/gP)	1,24 ± 0,76 ^d	1,75 ± 0,82 ^d	2,02 ± 1,31 ^d	3,46 ± 0,63
GSH (μmol/gP)	0,91 ± 0,18	1,01 ± 0,18	0,96 ± 0,39	0,98 ± 0,22
GPx (U/gP)	714,50 ± 220,60 ^c	924,00 ± 480,40	1062,00 ± 488,50	1085,00 ± 236,2
Vitamina E (μM)	13,40 ± 7,83	19,19 ± 12,81	17,16 ± 5,21	22,21 ± 6,48

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: c= p<0,05 em relação ao HLF; d= p<0,05 em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 10, temos os valores referentes à porcentagem de gotículas de gordura presente no fígado, onde só não foi observada diferença estatística entre os grupos CTM e HLF/M. O menor valor percentual foi observado no grupo CTS ($1,14 \pm 0,60$) e o maior no grupo HLF ($6,28 \pm 2,70$).

Tabela 10 – Porcentagem de gotículas lipídicas no fígado

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
% de gotículas	$1,14 \pm 0,60^{b,c,d}$	$3,08 \pm 1,58^c$	$6,28 \pm 2,70$	$3,33 \pm 1,96^c$

Valores expressos em média e desvio padrão, onde: a= $p < 0,05$ em relação ao CTS; b= $p < 0,05$ em relação ao CTM; c= $p < 0,05$ em relação ao HLF; d $p < 0,05$ em relação ao HLF/M. CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Tabela 11, temos a tabela de cruzes, referente a esteatose, inflamação e balonamento, onde esteatose e inflamação foram analisadas até quatro cruzes e o balonamento até três cruzes. Observamos que o grupo controle, embora não apresente esteatose e inflamação, é possível observar baixo balonamento. Já o grupo CTM foi quem apresentou baixa esteatose, porém moderada inflamação e balonamento, o grupo HLF, apresentou baixa esteatose, inflamação e balonamento. Enquanto o grupo HLF/M apresentou baixa esteatose e inflamação e moderado balonamento.

Tabela 11 – Tabela de cruzes: esteatose, inflamação e balonamento

	CTS	CTM	HLF	HLF/M
Esteatose	N	+	+	+
Inflamação	N	++	+	+
Balonamento	+	++	+	++

Classificação dos parâmetros observados: ausente (N), baixa (+), moderado (++), alto (+++) e severo (++++). CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Na Figura 4, temos as imagens referentes à histologia hepática, corada com H&E. É possível confirmar os achados apresentados na Tabela 13, na qual a imagem representada pela letra A corresponde ao grupo CTS, a letra B corresponde ao grupo CTM, a letra C o grupo HLF e a letra D o grupo HLF/M.

Figura 4- Histología hepática
(H&E)

A= Grupo CTS; B= Grupo CTM; C= Grupo HLF e D= Grupo HLF/M.

6. DISCUSSÃO

Quanto ao peso inicial, houve uma diferença estatística significativa apenas entre os grupos controles, porém nada que pudesse vir a interferir no peso final, uma vez que o período de experimento foi longo, com duração de 16 semanas.

Ao analisar o peso final e a média de consumo, percebemos que os grupos que receberam dietas hiperlipídicas apresentaram maior peso final e menor média de consumo diário, com uma ingestão energética diária maior. O mesmo foi observado em estudo realizado por Si et al. (2014). Estas observações são justificáveis, uma vez que a dieta apresenta maior quantidade de calorias por grama. Além disso, esses animais apresentaram uma maior TED, ou seja, maior eficiência da dieta para gerar o ganho de peso. Outro estudo mostrou que todos os grupos, controles e hiperlipídicas apresentaram a mesma ingestão diária de calorias, durante todo o experimento (ANTUNES et al., 2020). Em estudo realizado por Wall-Medrano et al. (2017), ao oferecer dieta com diferentes óleos (óleo de milho, de semente de uva e coco) não houve diferença na TED entre os grupos.

As dietas oferecidas apresentaram composições diferentes, interferindo em sua quantidade de calorias, nas quais os grupos controles (CTS e CTM) receberam uma dieta com 3,9 kcal/g da dieta, enquanto os grupos hiperlipídicos (HLF e HLF/M) receberam 6,1 kcal/g da dieta, sendo assim, uma dieta é normocalórica e outra hipercalórica, respectivamente, com uma diferença de 56% a mais de calorias por grama da dieta, em relação à outra. Assim, as dietas oferecidas aos grupos controles eram normocalóricas e normolipídicas, e as dietas oferecidas aos grupos hiperlipídicos eram hipercalóricas e hiperlipídicas, com 50% das calorias provenientes dos lipídeos. Para ser considerada uma dieta hiperlipídica deve apresentar de 45 a 75% do total das quilocalorias da dieta referente a lipídeos (JACOBS et al., 2016). Ao analisar, percebermos que o presente estudo condiz com a literatura pois, mesmo ingerindo uma menor quantidade de dieta, houve uma maior ingestão calórica, devido à composição das dietas, e apresentando consequentemente uma maior TED nos mesmos grupos.

A vantagem de se utilizar uma dieta hiperlipídica é a semelhança no desenvolvimento da esteatose no animal com a DHGNA humana, principalmente em relação a fisiopatologia, e, embora haja uma desvantagem em relação ao menor grau de gravidade da DHGNA por conta do tempo de desenvolvimento da doença, a diversificação da dieta com mono ou

dissacarídeos, podem ser considerados (VAN HERCK; VONGHIA; FRANQUE, 2017). Além da modificação da dieta em relação aos lipídeos, foi alterada também a fonte de carboidrato, na qual foi oferecida a frutose, sendo então condizente com a literatura, além ter tido a duração de 16 semanas.

No presente estudo o grupo CTM apresentou o menor ganho de peso e o grupo HLF o maior, entretanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos controles, o que era esperado, uma vez que a dieta hiperlipídica, é também hipercalórica, com 56% a mais de calorias em relação ao controle, levando assim a um maior ganho de peso. Ao adicionar óleo de milho no grupo hiperlipídica, o ganho de peso foi menor, ou seja, o grupo HLF/M, apresentou um menor ganho de peso quando comparado ao grupo HLF. Em estudo, após 12 semanas de experimento, foi observado que, ao oferecer dieta rica em gordura, houve um aumento significativo no peso corporal nos animais, quando comparado aos grupos controles (SHARMA; AGNIHOTRI, 2020). Asgari-Kafrani; Fazilati; Nazem (2019), observaram que o grupo hiperlipídica que recebeu 24% provenientes de óleo de milho em 100g da dieta, comparado ao controle com 5% de óleo de milho, aumentou significativamente o peso dos animais. Moral et al. (2016), em seu experimento com ratas fêmeas que receberam dieta hiperlipídica rica em óleo de milho após o desmame, apresentou um aumento no peso, enquanto o grupo que recebeu dieta hiperlipídica rica em óleo de oliva extra virgem o peso corporal não se alterou. Em outro estudo, ao oferecer uma dieta hiperlipídica com óleo de milho e outra com banha, as duas apresentaram uma diferença de aproximadamente três vezes no ganho de peso quando comparado ao controle, porém sem diferença entre esses dois grupos (PAVLISOVA et al., 2016). Outros autores observaram que o ganho de peso entre uma dieta rica em gordura, sendo sua principal composição o azeite de oliva comparado ao grupo com baixo teor de gordura, o ganho foi semelhante, e menor que no grupo que recebeu uma dieta rica em gordura proveniente do óleo de milho (SOSPEDRA et al., 2015).

Em estudo de Selenscig et al. (2018), os animais que receberam na dieta 62,5% sacarose + 8% de óleo de milho, após 8 meses apresentaram um aumento significativo no peso, quando comparado aos grupos que recebeu óleo de fígado de bacalhau e ao controle, que tinha em sua dieta amido de milho no lugar de sacarose. Já os dados do presente estudo, mostram que tanto nos grupos controles, quanto nos grupos hiperlipídicas, quando utilizado o óleo de milho, o peso final e o ganho de peso, apresentam menores valores, porém as fontes de carboidrato eram diferentes e também houve diferença no tempo do experimento.

No presente estudo o peso hepático só apresentou diferença estatística significativa entre os grupos CTM e HLF, sendo que o grupo CTM apresentou menor valor e HLF o maior valor, entre todos os grupos. Em estudo onde foram oferecidos diferentes óleos (óleo de milho, óleo de semente de uva e óleo de coco) não houve diferença no peso do fígado (WALL-MEDRANO et al., 2017). Já em estudo realizado por Saín et al. (2016), onde os animais receberam dietas com azeite, óleo de milho, canola, ou esses mesmos óleos e parcialmente óleo vegetal hidrogenado por 30 dias, proporção de 15,7% de calorias provenientes de gordura, o peso hepático também não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos. Outro estudo, no qual foram administradas dietas com 7% de óleo, sendo os grupos de óleo milho, azeite, e os mesmos óleos com adição de ácidos graxos trans, não houve diferença estatística significativa quando analisado o peso do fígado (SAÍN et al., 2013).

Em relação ao peso das gorduras epididimal, retroperitoneal e somas das mesmas, só não houve diferença significativa entre os grupos controles, sendo que os menores valores foram observados nos grupos controles e os maiores nos grupos hiperlipídicas, conforme o esperado. Ao oferecer dietas controles e dietas hiperlipídicas com óleo de milho e óleo de peixe, foi possível observar que os animais que receberam dietas hiperlipídicas apresentaram um maior peso significativo de gordura epididimal quando comparado aos grupos controles (SHARMA; AGNIHOTRI, 2020). Matsumura et al. (2018), ao oferecer aos animais água e óleo de milho, em garrafas separadas, à vontade, para o grupo experimental, enquanto o grupo controle recebeu apenas água, ambos receberam dieta padrão, não encontraram diferenças entre os grupos em relação ao peso da gordura epididimal. Em estudo realizado por Saín et al. (2016), onde os animais receberam dietas com azeite, óleo de milho, canola, ou esses mesmo óleos e parcialmente óleo vegetal hidrogenado por 30 dias, a gordura epididimal não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos. E em estudo realizado por Soni et al. (2015), os animais que receberam uma dieta hiperlipídica com óleo de milho, apresentaram um maior peso das gorduras epididimal e retroperitoneal em relação aos demais grupos.

A relação peso do fígado pelo peso total do animal não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Ao analisar a relação epididimal pelo peso e a soma dos tecidos pelo peso, podemos observar que apenas não houve diferença estatística entre os grupos controles (CTS e CTM), sendo que ao administrar uma dieta hiperlipídica com óleo de milho (HLF/M), o valor diminuiu, quando comparado ao HLF, e aumentou em relação aos controles. Em estudo realizado por El Midaoui et al. (2017), ao administrar aos animais

glicose e glicose mais óleo de milho, onde a glicose foi oferecida na água e o óleo de milho por gavagem, houve um aumento da gordura epididimal por peso, dos grupos que receberam glicose com ou sem óleo de milho, quando comparado ao controle. Em relação à gordura retroperitoneal pelo peso, podemos observar que os grupos controles apresentaram diferença quando comparado ao grupo HLF, e houve diferença também entre o grupo CTS e HLF/M, sendo que o maior valor foi observado no grupo HLF e menos no grupo CTS.

Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos quanto aos valores das enzimas hepáticas AST e ALT, foi observado um valor alto de desvio padrão em AST, e, embora o grupo CTS tenha apresentado simetria nos resultados, apresentou também um *outlier*; já os demais grupos apresentaram um desvio padrão alto e uma assimetria nos dados. Esses dados podem ser observados no Apêndice A. Já em relação a ALT os grupos CTS, CTM e HLF/M apresentaram *outliers*, e todos os grupos apresentaram assimetria nos dados, características que explicam os altos valores de desvio padrão e podem ser observados no Apêndice B. Ao adicionar o óleo de milho nos grupos, os valores de AST aumentaram, e os valores de ALT foram maiores no grupo CTM e menores no grupo HLF/M, porém sem significância estatística. Em estudo realizado por Asgari-Kafrani; Fazilati; Nazem (2019), os valores de AST e ALT ficaram significativamente maiores no grupo hiperlipídica quando comparado ao controle, onde foram utilizados óleo de milho. Outro estudo demonstrou que ao tentar induzir injúria hepática junto com a administração de azeite e óleo de soja, os mesmos diminuíram os valores de AST e ALT quando comparado com óleo de milho e banha (GAO et al., 2019). Ao oferecer uma dieta hiperlipídica com óleo de milho os valores de AST e ALT não apresentaram diferença quando comparado ao grupo controle (AL-SHAAIBI et al., 2016).

Em relação ao perfil lipídico do soro, observamos uma diferença estatística significativa na análise de colesterol total entre os grupos quando comparados ao grupo HLF, e entre os controles (CTS e CTM) quando comparado ao HLF/M, sendo que o menor valor foi observado no grupo CTS, enquanto o grupo HLF apresentou maior valor. Estudo mostrou que, ao oferecer uma dieta hiperlipídica com óleo de milho (50% banha e 10% óleo de milho) aos animais, não houve diferença significativa nos valores de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL (SHARMA; AGNIHOTRI, 2020). Em estudo realizado por Si et al. (2014), comparado ao controle, o grupo que recebeu dieta com 10% de óleo de milho, apresentou valores maiores de colesterol total, HDL e triglicerídeos.

No presente estudo os valores de triglicerídeos, não apresentaram diferença, porém o grupo HLF/M apresentou *outliers*, fazendo com que o desvio padrão nesse grupo seja maior.

Nos grupos controles, observamos uma maior dispersão dos resultados, podendo esses interferir no resultado da análise estatística, como é possível observar no Apêndice C. Já em um estudo realizado por Pavlisova et al. (2016), camundongos alimentados com dieta hiperlipídica com óleo de milho *versus* hiperlipídica com banha, o triglicerídeo plasmático foi significativamente menor no grupo que recebeu dieta com banha. No presente estudo, embora tenham sido observadas diferenças estatísticas significativas em relação ao HDL, o grupo CTM apresentou uma maior dispersão nos resultados, e, conseqüentemente, um elevado desvio padrão, que podem ser observados no Apêndice D, porém os grupos que receberam óleo de milho apresentaram menores valores. Quanto ao VLDL, observamos o mesmo padrão referente aos triglicerídeos, que podem ser vistos no Apêndice E.

Em relação à glicemia, não houve diferença estatística entre os grupos, porém quando adicionado óleo de milho tanto no controle, quando no hiperlipídico, os valores diminuem discretamente. Em estudo realizado por Mostafa; Satti, (2020), ao analisar a glicose plasmática o grupo que recebeu dieta padrão e o que recebeu dieta hiperlipídica com óleo de milho, não encontraram diferenças estatísticas significativas. Já a relação TRI/HDL, houve diferença entre o grupo CTM, quando comparados aos demais grupos, sendo que o mesmo apresentou o maior valor. Embora sem diferença significativa entre os grupos, o grupo CTM apresentou menor valor de glicemia, porém maior relação TRI/HDL. Uma vez que essa relação permite não apenas verificar a resistência insulina, mas também um maior risco de distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares (FAN et al., 2011), podemos perceber que o que apresenta maior risco entre os grupos, é o grupo CTM. Estudo realizado por Wong et al. (2015), mostrou que camundongos alimentados com óleo de milho apresentaram resistência à insulina.

Ao analisarmos o perfil lipídico hepático, percebemos que o grupo CTS apresentou menor valor de gordura total e de triglicerídeos, enquanto o colesterol total mostrou-se em menor concentração nos grupos HLF e HLF/M. Além disso notamos que os grupos controles apresentaram uma maior dispersão nos resultados, gerando um maior desvio padrão nesses dois grupos, como podemos ver no Apêndice F. Em estudo realizado por Soni et al., (2015), os animais que receberam uma dieta hiperlipídica com óleo de milho apresentaram maiores valores quando comparados ao controle referentes à colesterol, triglicerídeos e também lipídeos hepáticos totais. Ao oferecer uma dieta com óleo de milho e outra com azeite, não houve diferença entre esses dois grupos em relação ao valor de triglicerídeos hepáticos (SAÍN et al., 2013).

Quanto aos marcadores do estresse oxidativo, não houve diferença estatística entre os grupos. A FOX apresenta algumas características nos dados obtidos que podem explicar essa não diferença estatística entre os grupos, como altos valores de desvio padrão dos grupos CTM, HLF e HLF/M além do grupo CTS ter apresentado *outliers*, como pode ser observado no Apêndice G. Embora o presente estudo não tenha apresentado diferença estatística significativa para valores de MDA do tecido hepático, quando adicionado o óleo de milho tanto no controle, quanto no hiperlipídica, os valores de MDA diminuem, porém em estudo realizado por Haggag; Elsanhoty; Ramadan (2014), o grupo que recebeu óleo de milho em sua dieta apresentou um aumento significativo nos níveis de MDA, tanto do fígado, como do soro, quando comparado aos demais óleos. Outro estudo observou que, ao utilizar óleo de milho na dieta, a mesma evitou o aumento nos níveis de ácido tiobarbitúrico (TAN et al., 2013), uma vez que essa análise determina a quantidade de MDA na amostra, podemos perceber que o óleo de milho foi capaz de evitar o aumento do mesmo.

Haggag; Elsanhoty; Ramadan (2014), concluiu em seu experimento que o óleo de milho aumenta a peroxidação lipídica de forma significativa, portanto desafia o sistema de defesa antioxidante.

Em relação aos valores hepáticos da capacidade antioxidante, percebemos que CAT não apresentou diferença, porém é possível observar que os dados apresentam uma grande dispersão, além de não apresentar simetria, podendo esses fatores interferir nos resultados, como mostra o Apêndice H. Em estudo realizado por Al-Shaabi et al. (2016), também não houve diferença estatística significativa referente à CAT ao comparar o grupo controle com o grupo hiperlipídica que recebeu óleo de milho.

Quanto à GSH (Apêndice I) e Vit. E (Apêndice J), não houve diferença, porém, foi observada grande dispersão nos resultados em alguns grupos, visto o maior desvio padrão. Outro ponto observado a se levar em conta sobre essas duas análises é que, quando adicionado o óleo de milho, tanto no controle quanto no hiperlipídica, os valores se apresentaram um pouco maiores, embora sem diferença significativa. Em estudo realizado por Al-Shaabi et al. (2016), ao oferecer uma dieta hiperlipídica com óleo de milho, o mesmo apresentou um menor valor significativo de GSH, quando comparado ao grupo controle. Haggag; Elsanhoty; Ramadan (2014) ao utilizar cinco diferentes fontes de gorduras, entre eles o óleo de milho, não encontrou diferença nos valores de vitamina E quando comparado aos outros.

O DPPH apresentou diferença estatística significativa entre os grupos quando comparado ao grupo HLF/M e é possível observar que, quando adicionado óleo de milho nos grupos, os valores se apresentam maiores. O mesmo acontece com a GPx, porém, nessa análise, a única diferença estatística significativa observada foi entre os grupos CTS e HLF. Em estudo realizado por Al-Shaabi et al. (2016), também não houve diferença estatística significativa de GPx ao comparar o grupo hiperlipídica que recebeu óleo de milho, com o grupo controle.

A porcentagem de gotículas de gordura apresentou diferença entre os grupos que receberam dietas hiperlipídicas, tendo o grupo HLF apresentado o maior valor; tal grupo também apresentou diferença quando comparado ao CTS. De acordo com estudo, ao oferecer uma dieta hiperlipídica com óleo de milho e outra com banha aos animais, os grupos apresentaram um maior acúmulo de lipídeos nos tecidos quando comparados ao controle, enquanto o segundo grupo apresentou um nível mais elevado de esteatose (PAVLISOVA et al., 2016), o que condiz com o achado. A partir desse achado, espera-se que o grupo HLF apresente um maior grau de esteatose que os demais grupos, porém, quando analisamos a tabela de cruzes, observamos que esse grupo se mantém igual aos grupos CTM e HLF/M, possivelmente devido ao alto valor do desvio padrão apresentado no grupo HLF quando observamos a porcentagem de gotículas de gorduras.

Na histologia podemos observar que, entre os grupos que possuem em sua composição o óleo de milho, o grupo CTM apresentou baixa esteatose e moderada inflamação e balonamento, demonstrando pior qualidade histológica, principalmente em relação à inflamação, quando comparado ao HLF/M, que tem em sua composição uma maior porcentagem de óleo de milho. Dessa forma, com uma menor porcentagem de óleo de milho foi possível observar uma maior inflamação causada no fígado. Porém um estudo realizado por Asgari-Kafrani; Fazilati; Nazem (2019), o grupo controle que recebe 5% de óleo de milho na dieta não apresentou alterações no tecido hepático, já no grupo hiperlipídica que recebeu 24% provenientes de óleo de milho, apresentou alterações, incluindo gordura micro e macro vesicular e também presença de inflamação. Em estudo realizado por Tan et al. (2013), os grupos que receberam óleo de milho apresentaram um menor grau de esteatose hepática, sem infiltrados de células inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo verificou que, embora nos grupos que receberam em sua composição óleo de milho os resultados de peso final, ganho de peso, peso do fígado, das gorduras epididimal, retroperitoneal e somas das gorduras tenham se mantido abaixo do grupo HLF, outras análises bioquímicas não apresentaram resultados tão favoráveis. O grupo CTM, que recebeu menor quantidade do óleo (7%), apresentou numericamente valores maiores de AST e ALT, indicando uma possível injúria celular, que pode ser confirmado com a histologia, pois o mesmo foi quem apresentou os piores resultados na análise histopatológica, apresentando esteatose (+), inflamação (++) e balonamento (++), além de apresentar um maior acúmulo de gotículas de gordura quando comparado ao controle soja; também neste grupo houve uma maior relação TRI/HDL, indicando, assim, uma possível maior resistência à insulina. Porém quando oferecido o óleo de milho junto a banha e a frutose, o óleo de milho parece prevenir uma piora no quadro de acúmulo de gordura no fígado, e uma melhora nos parâmetros bioquímicos. Quanto às análises referentes ao estresse oxidativo e capacidade antioxidante, não houve diferença que pudesse justificar ou pelo menos explicar os resultados encontrados no tecido hepático.

Sendo assim, ao modular a dieta substituindo o óleo de soja pelo óleo de milho, não resultou em alterações favoráveis, e em maior quantidade associado à dieta hiperlipídica e rica em frutose houve uma ação positiva, mesmo que parcial, na esteatose hepática.

8. REFERÊNCIAS

- ABENAVOLI, L. et al. Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 45, p. 16831–16840, 2014.
- ADAMS, L. A.; ANGULO, P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 9, p. 1129–1133, set. 2005.
- AL-SHAAIBI, S. N. K. et al. Ameliorative effects of pomegranate peel extract against dietary-induced nonalcoholic fatty liver in rats. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 21, n. 1, p. 14–23, 2016.
- ALVES-BEZERRA, M.; COHEN, D. E. Triglyceride metabolism in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2018.
- ANTONUCCI, L. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and nutritional implications: Special focus on copper. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–12, 2017.
- ANTUNES, M. M. et al. Chronic ingestion of Primex-Z, compared with other common fat sources, drives worse liver injury and enhanced susceptibility to bacterial infections. **Nutrition**, v. 81, 2021.
- ARISQUETA, L. et al. High-fat diet overfeeding promotes nondetrimental liver steatosis in female mice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 315, n. 5, p. G772–G780, 2018.
- ARNAUD, J. et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 572, n. 1–2, p. 103–116, 1991.
- ASGARI-KAFRANI, A.; FAZILATI, M.; NAZEM, H. Hepatoprotective and antioxidant

activity of aerial parts of *Moringa oleifera* in prevention of non-alcoholic fatty liver disease in Wistar rats. **South African Journal of Botany**, 2019.

BELLENTANI, S. et al. Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 1, p. 155–161, jan. 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, 1959.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

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

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005–2023, 2012.

CHAN, K. L. et al. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16979–16988, 2015.

COSTA, M. R. et al. Lycopene Modulates Pathophysiological Processes of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Rats. p. 1–17, 2019.

CUI, Y. et al. Effect of traditional Chinese cooking methods on fatty acid profiles of vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 233, p. 77–84, 2017.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? **Gastroenterology**, v.

114, n. 4 I, p. 842–845, 1998.

DIEHL, A. M.; DAY, C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 21, p. 2063–2072, 2017.

DONGIOVANNI, P. et al. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 29, p. 1–11, 2016.

DOWMAN, J. K. et al. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of a high-fat/fructose diet and sedentary lifestyle. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 5, p. 1550–1561, 2014.

DRESCHER, H. K. et al. The Influence of Different Fat Sources on Steatohepatitis and Fibrosis Development in the Western Diet Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–17, 2019.

DYSON, J.; DAY, C. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive Diseases**, v. 32, n. 5, p. 597–604, 2014.

EL-AGROUDY, N. N. et al. Are Lifestyle Therapies Effective for NAFLD Treatment? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 10, p. 701–709, 2019.

EL MIDAOU, A. et al. Argan oil as an effective nutri-therapeutic agent in metabolic syndrome: A preclinical study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 1–16, 2017.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.

ESLAMPARAST, T. et al. Recent advances in dietary supplementation, in treating non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 2, p. 204–212, 2015.

ESTEVEES, G. P. et al. A fish oil-rich diet leads to lower adiposity and serum triglycerides but increases liver lipid peroxidation in fructose-fed rats. **Egyptian Liver Journal**, v. 10, n. 1, 2020.

FAN, X. et al. Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio: A Surrogate to Predict Insulin Resistance and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Particle Size in Nondiabetic Patients With Schizophrenia. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72, n. 06, p. 806–812, 15 jun. 2011.

FAZEL, Y. et al. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1017–1025, 2016.

FERRAMOSCA, A.; DI GIACOMO, M.; ZARA, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 23, p. 4146–4157, 2017.

FESTI, D. et al. Hepatic steatosis in obese patients : clinical aspects and. **Obesity reviews**, v. 5, n. 1, p. 27–42, 2004.

FIGUEIREDO, P. S. et al. Fatty acids consumption: The role metabolic aspects involved in obesity and its associated disorders. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–32, 2017.

GAO, Y. et al. Differential effects of olive oil, soybean oil, corn oil and lard oil on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 10, p. 1–8, 2019.

GARCIA-JARAMILLO, M. et al. **Correction: Lipidomic and transcriptomic analysis of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in female Ldlr -/- mice (PLoS One (2019) 14:4 (e0214387) DOI: 10.1371/journal.pone.0214387).** [s.l: s.n.]. v. 14

GÉRARD-MONNIER, D. et al. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1176–1183, out. 1998.

GUNN, N. T.; SHIFFMAN, M. L. The Use of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: When to Biopsy and in Whom. **Clinics in Liver Disease**, v. 22, n. 1, p. 109–119, 2018.

HAGGAG, M. E. S. Y. E. S.; ELSANHOTY, R. M.; RAMADAN, M. F. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 52–58, 2014.

JACOBS, A. et al. An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. **Current protocols in mouse biology**, v. 6, n. 2, p. 185–200, 2016.

JENSEN, T. et al. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 68, n. 5, p. 1063–1075, 2018.

KAMARAJAH, S. K. et al. Repeated liver stiffness measurement compared with paired liver biopsy in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology International**, v. 12, n. 1, p. 44–55, 2018.

KANG, M. J.; AHN, H. S.; LEE, S. S. 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. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 49, n. 5, p. 304–311, 2005.

KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313–1321, 2005.

LIN, S. et al. Risk factors and community intervention for nonalcoholic fatty liver disease in community residents of Urumqi, China. **Medicine (United States)**, v. 97, n. 9, 2018.

LUDWIG, J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980 Jul;55(7):434-8. PMID: 7382552.

MARCHESINI, G.; RODEN, M.; VETTOR, R. EASL–EASD–EASO Clinical Practice

Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1388–1402, jun. 2016.

MATSUMURA, S. et al. Voluntary Corn Oil Ingestion Increases Energy Expenditure and Interscapular UCP1 Expression Through the Sympathetic Nerve in C57BL/6 Mice.

Molecular Nutrition and Food Research, v. 62, n. 22, p. 1–14, 2018.

MORAL, R. et al. Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 1397–1409, 2016.

MOSTAFA, D. G.; SATTI, H. H. Resolvin D1 Prevents the Impairment in the Retention Memory and Hippocampal Damage in Rats Fed a Corn Oil-Based High Fat Diet by Upregulation of Nrf2 and Downregulation and Inactivation of p66Shc. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 7, p. 1576–1591, 2020.

MUNDI, M. S. et al. Evolution of NAFLD and Its Management. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 35, n. 1, p. 72–84, 2020.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202–1219, 2003.

PAVLISOVA, J. et al. Corn oil versus lard: Metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition. **Biochimie**, v. 124, p. 150–162, 2016.

RAZA, S. et al. Molecular links between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma. **Hepatoma Research**, v. 2019, 2019.

RICHARDSON, C. E. et al. Lipidomic Analysis of Oxidized Fatty Acids in Plant and Algae Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

IODAN, J. D.; NADEAU, J. H. Modeling progressive non-alcoholic fatty liver disease in

the laboratory mouse. **Mammalian Genome**, v. 25, n. 9–10, p. 473–486, 2014.

RUSU, E. et al. Medical nutrition therapy in non-alcoholic fatty liver disease--a review of literature. **Journal of medicine and life**, v. 8, n. 3, p. 258–262, 2015.

SAADEH, S. et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 123, n. 3, p. 745–750, 2002.

SAÍN, J. et al. Effects of trans-fatty acids on liver lipid metabolism in mice fed on diets showing different fatty acid composition. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 62, n. 3, p. 242–249, 2013.

SAÍN, J. et al. The effects of trans-fatty acids on TAG regulation in mice depend on dietary unsaturated fatty acids. **The British journal of nutrition**, v. 116, n. 4, p. 611–20, 13 ago. 2016.

SAMJI, N. S. et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology of Recurrence and Clinical Challenges. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 64, n. 12, p. 3413–3430, 2019.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270–276, fev. 1998.

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

SELENSCIG, D. et al. Dietary fish oil ameliorates adipose tissue dysfunction in insulin-resistant rats fed a sucrose-rich diet improving oxidative stress, peroxisome proliferator-activated receptor γ and uncoupling protein 2. **Food and Function**, v. 9, n. 4, p. 2496–2507, 2018.

SHARMA, P.; AGNIHOTRI, N. Fish oil and corn oil induced differential effect on beiging of

visceral and subcutaneous white adipose tissue in high-fat-diet-induced obesity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 84, p. 108458, 2020.

SI, H. et al. High corn oil dietary intake improves health and longevity of aging mice. **Experimental Gerontology**, v. 58, p. 244–249, 2014.

SIDDIQUI, R. A. et al. Comparative study of the modulation of fructose/sucrose-induced hepatic steatosis by mixed lipid formulations varying in unsaturated fatty acid content. **Nutrition and Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2015.

SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. **Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease** *Digestive Diseases and Sciences*, 2016.

SONI, N. K. et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2015.

SOSPEDRA, I. et al. Effect of High Fat Diets on Body Mass, Oleylethanolamide Plasma Levels and Oxytocin Expression in Growing Rats. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. H1425–H1431, 2015.

TAN, T. C. H. et al. A corn oil-based diet protects against combined ethanol and iron-induced liver injury in a mouse model of hemochromatosis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 10, p. 1619–1631, 2013.

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

TORRES, M. C. P. et al. Mediterranean diet and NAFLD: What we know and questions that still need to be answered. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 1–19, 2019.

VAN HERCK, M. A.; VONGHIA, L.; FRANCQUE, S. M. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter's guide. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–13, 2017.

WALL-MEDRANO, A. et al. Lipidomic and antioxidant response to grape seed, corn and coconut oils in healthy wistar rats. **Nutrients**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2017.

WANG, H. et al. Comparative proteomic analysis of fibrotic liver of rats fed high fat diet contained lard versus corn oil. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 198–208, 2017.

WONG, C. K. et al. A high-fat diet rich in corn oil reduces spontaneous locomotor activity and induces insulin resistance in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 319–326, 2015.

YAN, T. et al. Herbal drug discovery for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 1, p. 3–18, 2020.

YKI-JÄRVINEN, H. Nutritional modulation of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9127–9138, 2015.

YOUNOSSI, Z. M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, v. 64, n. 1, p. 73–84, 2016.

YOUNOSSI, Z. M. et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 71, n. 4, p. 793–801, 2019.

9. APÊNCIDES

Apêndice A – Figura 5 - Gráfico AST (U/mL)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice B – Figura 6 - Gráfico ALT (U/mL)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice C – Figura 7 - Gráfico Triglicerídeos Soro (mg/dL)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice D – Figura 8 - Gráfico HDL Soro (mg/dL)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice E – Figura 9 - Gráfico VLDL Soro (mg/dL)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice F – Figura 10 - Gráfico Colesterol Total Hepático (mg/gG)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice G – Figura 11 - Gráfico FOX (nmol/gPT)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice H – Figura 12 - Gráfico CAT (μmol/gPT)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice I – Figura 13 - Gráfico GSH ($\mu\text{mol/gPT}$)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

Apêndice J – Figura 14 - Gráfico Vitamina E (μM)

CTS = Grupo controle soja (7%), CTM = Grupo controle milho (7%), HLF = Grupo hiperlipídica banha (50%) e HLF/M = Grupo hiperlipídica banha + milho (25% + 25%).

10. ANEXOS

Anexo 1 – Comitê de Ética Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement

FMRP
65 anos USP

CERTIFICADÓ

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Efeito de diferentes óleos vegetais no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose*", registrado com o número **129/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Alceu Afonso Jordao Junior**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordocom os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 30 de julho de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 108 camundongos C57Bl/6 machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 30/07/2018 a 17/09/2021.

We certify that the Protocol n° 129/2018, entitled "*Effect of different vegetable oils in lipid metabolism and oxidative stress in C57/Bl mice fed with hyperlipidic diet and rich in fructose*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/30/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans) for research purposes, and includes the use of 108 male C57Bl/6 mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/17/2021.

Ribeirão Preto, 30 de julho de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP