



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



CAMILA SANCHES MANCA

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E GENÔMICAS EM CAMUNDONGOS C57/BL6  
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E RICA EM FRUTOSE SUPLEMEN-  
TADOS COM ÓLEO DE CANOLA E/OU RESVERATROL**

RIBEIRÃO PRETO

2023

CAMILA SANCHES MANCA

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS E GENÔMICAS EM CAMUNDONGOS C57/BL6  
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E RICA EM FRUTOSE SUPLEMEN-  
TADOS COM ÓLEO DE CANOLA E/OU RESVERATROL**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior.

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Bueno de Queiroz Arruda

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

Catálogo na publicação Biblioteca da Universidade de São Paulo

Manca, Camila Sanches

Alterações metabólicas e genômicas em camundongos C57/BL6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose suplementados com óleo de canola e/ou resveratrol - Camila Sanches Manca, Ribeirão Preto, 2023. 93 p; il.;30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior.

Coorientador: Profa. Dra. Ana Carolina Bueno de Queiroz Arruda

1. Resveratrol. 2. Óleo de canola. 3. Estresse oxidativo. 4. Esteatose hepática não-alcóolica

Nome: MANCA, Camila Sanches

Título: Alterações metabólicas e genômicas em camundongos C57/BL6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose suplementados com óleo de canola e/ou resveratrol

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esse trabalho a Deus,  
Minha família, meu orientador.

## **AGRADECIMENTOS**

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

Agradeço a meu querido orientador Prof. Alceu Afonso Jordão Junior pela amizade, oportunidade concebida, pela confiança e todo conhecimento e orientação transmitido ao longo destes anos. Obrigado por acreditar no meu potencial e abrir as oportunidades, além de me dar todo suporte para que esse trabalho fosse possível.]

Agradeço a parceria e o cuidado da minha Coorientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Bueno.

Agradeço imensamente a minha família, meu marido David por estar sempre ao meu lado, me apoiando e dando forças para que a caminhada fosse possível, além de toda paciência. Adelle e Betina, por estarem sempre ao meu lado e o entendimento. Aos meus pais José Ricardo e Flávia, minha madrasta Lusia Geromel, meus avós, Lubélia, Valentim e Lena pelo amor, dedicação, apoio nas horas difíceis e todos os ensinamentos.

Apoio técnico do biotério: Roni Charles e Carlos gostariam imensamente de agradecer todo conhecimento compartilhado e pelos dias agradáveis.

Agradeço apoio técnico e amizade Livia no Laboratório de Imunologia. Renata e Wendy pelo apoio técnico e toda paciência no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo.

Agradeço aos colegas de pós graduação e graduação. Juliana Sicchieri pela amizade e apoio na trajetória acadêmica.

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

Agradeço Prof. Mariane, Flávia, Paulo pela parceria, paciência e os ensinamentos em todos as etapas do experimento.

Agradeço ao secretário da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica, Emerson Quirino de Oliveira dedicação e paciência.

Agradeço a Clínica Médica pela oportunidade.

Agradeço a agências de fomento pelo apoio e oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

O presente trabalho foi realizado com apoio de bolsa pela CNPQ –processo nº 170389/2017-0.

## RESUMO

MANCA, C. S. **Alterações metabólicas e genômicas em camundongos C57/BL6 alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose suplementados com óleo de canola e/ou resveratrol**. 2023. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2023.

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA) está relacionada às causas crescentes de morbimortalidade de doenças hepáticas e sua incidência está associada à obesidade e suas comorbidades. A modulação lipídica dietética e a oferta conjunta a suplementação de um antioxidante podem resultar na preservação do parênquima hepático ou reduzir a taxa de progressão para as formas mais graves da doença hepática não alcoólica, apoiando novas diretrizes nutricionais baseadas em evidências de forma a para sustentar princípios alimentares que sejam adequados e eficazes na prevenção da doença, sendo um alvo terapêutico relevante e de baixo custo na prevenção e tratamento da EHNA. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar o uso do óleo de canola isolado, em associação com resveratrol ou com resveratrol isolado na prevenção ou redução da esteatose hepática. Material e Métodos: os animais foram divididos nos seguintes grupos: Controle Soja (n=12) + HLF(n=12) Grupo HLF<sub>CN</sub> (n=12); Grupo CTCN/RVS (n=12); Grupo HLF/RVS (n=12); Grupo HLF/CN/RVS (n=12). Após 16 semanas de dieta e tratamento com o óleo de canola e resveratrol, os animais foram anestesiados e o sangue retirado e os tecidos para as análises posteriores. Entre os resultados encontrados a oferta de uma dieta rica em gordura saturada (banha) + frutose ocasionou um aumento do peso no grupo HLF enquanto a administração do óleo e resveratrol ou ambos foi capaz de retardar o ganho de peso. A soma dos tecidos adiposos epididimal e retroperitônio foi maior no HLF enquanto houve redução significativa em relação aos grupos suplementados com resveratrol, sendo que o tecido adiposo epididimal reduziu somente nos grupos CT/RVS e HLF/CN/RVS. Para o acúmulo de gordura total, o HLF apresentou maior valor em relação a gordura hepática total, enquanto o HLF/RVS apresentou uma maior quantidade em relação ao HLF/CN/RVS. Os TGs e CT os grupos suplementados apresentaram uma menor quantidade em relação ao HLF, exceto para TGs que foi menor no HLF/CN. Os dados corroboram positivamente com score de esteatose e % de gotícula lipídica com exceção do HLF/RVS que apresentou uma maior quantidade em relação aos tratados. Para parâmetros relacionados a estresse oxidativo, MDA, FOX foram maiores no HLF e menor nos suplementados e maiores quantidade de antioxidantes Vitamina E e GSH. O metabolismo lipídico é controlado por genes. O SREBP-1c foi mais expresso no HLF/RVS em relação CT/RVS 2g corroborando com os achados histológicos. O CHERB apresentou maior expressão em relação ao HLF/RVS o que corrobora com aumento do acúmulo de TGs neste grupo. Dessa forma, o uso de óleo de canola em associação com resveratrol parece ser uma alternativa interessante para prevenção/tratamento de esteatose em uma dieta rica estilo ocidental, visando ser uma alternativa de baixo custo e fácil aplicabilidade em pacientes com NAFLD, o que não ficou tão evidente em nosso estudo apenas com o canola e/ou resveratrol.

Palavras-chave: Esteatose hepática não alcoólica. Resveratrol. Frutose. Ácidos graxos poli-insaturados.



## ABSTRACT

MANCA, C.S. **Metabolic and genomic changes in C57/BL6 mice fed a high-fat, high-fructose diet supplemented with canola oil and/or resveratrol**. 2023. 93 f. Thesis (PhD) – Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, 2023.

Non-alcoholic hepatic steatosis is related to the increasing causes of morbidity and mortality from liver diseases. Its incidence is related to obesity and related comorbidities, in which it has aroused great interest in research. Dietary lipid modulation and joint provision of antioxidant supplementation may result in preservation of the hepatic parenchyma or reduce the rate of progression to more severe forms of non-alcoholic liver disease, supporting new evidence-based nutritional guidelines in a way a to support dietary principles that are adequate and effective in preventing the disease, being a relevant and low-cost therapeutic target in the prevention and treatment of NASH. The objectives of the present study were: to evaluate the consumption of isolated canola oil, in association with resveratrol or with isolated resveratrol in the prevention or reduction of hepatic steatosis, analyzing parameters of hepatic lipid metabolism, oxidative stress and delaying the progression of NAFLD. Material and Methods: the animals were divided into the following groups: Soy Control (n=12) + HLF (n=12) HLFCN Group (n=12); CT/RVS group (n=12); HLF/RVS group (n=12); HLF/CN/RVS group (n=12). After 16 weeks of diet and treatment with canola oil and resveratrol, the animals were anesthetized and the blood and tissues were removed by cardiac puncture for later analysis. Results: The offer of a diet rich in saturated fat (lard) + fructose caused an increase in weight in the HLF group, while the administration of oil and resveratrol or both was able to delay weight gain. Liver weight had no significant difference. The sum of epididymal and retroperitoneal adipose tissue was greater in the HLF while there was a significant reduction in relation to the groups supplemented with resveratrol, and the epididymal adipose tissue reduced only in the CT/RVS and HLF/CN/RVS groups. For total fat accumulation, the HLF showed a higher value in relation to total liver fat, while the HLF/RVS showed a higher amount in relation to the HLF/CN/RVS. The TGs and CT the supplemented groups showed a lower amount compared to the HLF, except for TGs which was lower in the HLF/CN. The data corroborate positively with the steatosis score and % of lipid droplet, with the exception of the HLF/RVS, which presented a greater amount in relation to the treated ones. For parameters related to oxidative stress, MDA, FOX were higher in HLF and lower in supplemented and higher amounts of antioxidants Vitamin E and GSH. Lipid metabolism is controlled by genes. SREBP-1c was more expressed in HLF/RVS compared to CT/RVS 2g, corroborating the histological findings. CHERB showed greater expression than HLF/RVS, which positively corroborates the increase in the accumulation of TGs in this group. Thus, the use of canola oil in association with resveratrol seems to be an interesting alternative for the prevention/treatment of steatosis in a rich Western-style diet, aiming to be a low-cost alternative and easy to apply in patients with NAFLD, which it was not so evident in our study just with canola and/or resveratrol.

**Keywords:** Non-alcoholic hepatic steatosis. Resveratrol. Fructose. Polyunsaturated fatty acids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de dano hepático por sobrecarga de substratos na patogênese da EHNA .....	17
Figura 2 – Avaliação das amostras de RNA hepático em gel de agarose 1,2%.....	32
Figura 3 – Evolução do peso semanal dos animais ao longo das 16 semanas experimentais .....	38
Figura 4 – Peso final dos animais ao final do experimento (g) .....	39
Figura 5 – Ingestão alimentar ao longo das semanais.....	40
Figura 6 – Parâmetros Inflamatórios e hormonais .....	44
Figura 7 – MDA, FOX, GSH, Vitamina E nos diferentes grupos experimentais.....	46
Figura 8 – Gordura hepática total, triacilgliceróis, colesterol total.....	47
Figura 9 – Características histológicas do tecido hepático dos animais experimentais .....	48
Figura 10 – Genes envolvidos com metabolismo lipídico .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta baseada na AIN-93 crescimento g/100 g da dieta, 2023.....	26
Tabela 2 – Genes-alvo marcadores do metabolismo lipídico avaliados no estudo.....	33
Tabela 3 – Composição percentual da banha e óleos vegetais comerciais utilizados neste estudo, Ribeirão Preto, 2023. ....	36
Tabela 4 – Índice de peroxidabilidade (IP) dos óleos e da gordura utilizados nas dietas experimentais .....	37
Tabela 5 – Índice de peroxidabilidade (IP) das dietas experimentais .....	37
Tabela 6 – Peso inicial, peso final, ganho de peso, ingestão alimentar, ingestão energética, consumo diário resveratrol .....	41
Tabela 7 – Peso hepático, peso tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, somatória e razões em relação ao peso corporal (g).....	43
Tabela 8 – Valores hepáticos de MDA, GSH, FOX e Vitamina E nos diferentes grupos experimentais .....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGS: ácidos graxos saturados

ALT: alanina aminotransferase.

AST: aspartato aminotransferase

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

CT: grupo controle

DHA: ácido docosaenoico

EHNA: esteatose hepática não alcoólica

EROs: espécies reativas de oxigênio

EPA: ácido eicosapentaenoico

GSH: glutationa reduzida

HDL: lipoproteína de alta densidade

HLF/CN: hiperlipídica e frutose + canola

HLF/RVS: hiperlipídica e frutose + resveratrol

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MDA: malondialdeído

MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados

n-3: ácido graxo poli-insaturado ômega-3

n-6: ácido graxo poli-insaturado ômega-6

NAFLD: *non-alcoholic fatty liver disease*

NASH: *non-alcoholic steato-hepatitis* ou esteatohepatite não alcoólica

PPAR- $\alpha$ : *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* ou receptor ativado por proliferadores de peroxissoma. alfa

PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados

RI: resistência à insulina

ERNs: espécies reativas do nitrogênio

SCARB1: *scavenger receptor class B, member 1*

SFA: ácido graxo saturado

SM: síndrome metabólica.

SREBP-1c: *sterol regulatory element-binding proteins 1c* ou proteína de regulação ao elemento regulador de esterol 1C.

TGs: triacilgliceróis\*

Nota: devido à denominação mais usual, foram usados os termos em inglês para ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, bem como NASH e NAFLD.

Triacilgliceróis e triglicerídeos foram usados como sinônimos no texto.

## LISTA DE ÁCIDOS GRAXOS – NOMENCLATURA USUAL

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Contextualização</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Papel da dieta na esteatose</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 Alternativas de prevenção/progressão da EHNA</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 Definição do problema e questão da pesquisa</b> .....	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Considerações éticas</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Animais</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Delineamento experimental</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4 Análises quantitativas</b> .....	<b>27</b>
3.4.1 Quantificação da composição dos ácidos graxos dietéticos utilizados no preparo das dietas .....	28
3.4.2 Análises hepáticas.....	28
3.4.3 Determinação de proteína hepática.....	28
3.4.4 Determinação de hidróxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX) .....	29
3.4.5 Peroxidação lipídica.....	29
3.4.6 Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) hepática.....	29
3.4.7 Quantificação de vitaminas E hepática.....	30
3.4.8 Análise hormonal e das adipocinas séricas.....	30
<b>3.5 Análise histopatológica</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6 Análise molecular</b> .....	<b>31</b>
3.6.1 Extração do RNA .....	31
3.6.2 Síntese do cDNA .....	33
3.6.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	33
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	<b>34</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Composição percentual de ácidos graxos da banha e do óleo de canola     utilizados para o preparo das dietas experimentais (%)</b> .....	<b>35</b>

4.2 Índice de peroxidabilidade da banha de porco e dos respectivos óleos vegetais comerciais utilizados nas dietas experimentais .....	37
4.4 Ingestão alimentar, ingestão energética e taxa de eficiência da dieta (TED) .....	39
4.5 Peso dos tecidos hepático, adiposo epididimal e retroperitoneal e suas razões em relação ao peso corporal.....	41
4.5 Parâmetros inflamatórios e hormonais.....	43
4.6 Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo .....	44
4.7 Gordura hepática total, triglicerídeos e colesterol hepáticos.....	46
4.9 Análise histopatológicas .....	47
4.10 Análise da expressão gênica relativa.....	49
DISCUSSÃO .....	51
6 CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO 1.....	65



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização

A esteatose hepática não alcóolica (EHNA) é uma condição clínico-patológica que inclui um amplo espectro de doenças hepáticas, sendo um grande problema em saúde pública devido ao aumento mundial de sua prevalência e possibilidade de evolução para sequelas mais graves. O rápido crescimento da incidência de EHNA resulta de uma complexa interação entre susceptibilidade genética e outros fatores ambientais, dentre eles, dietas hipercalóricas e inatividade física (DONGIOVANNI; VALENTI, 2017; MANNE; HANDA; KOWDLEY, 2018).

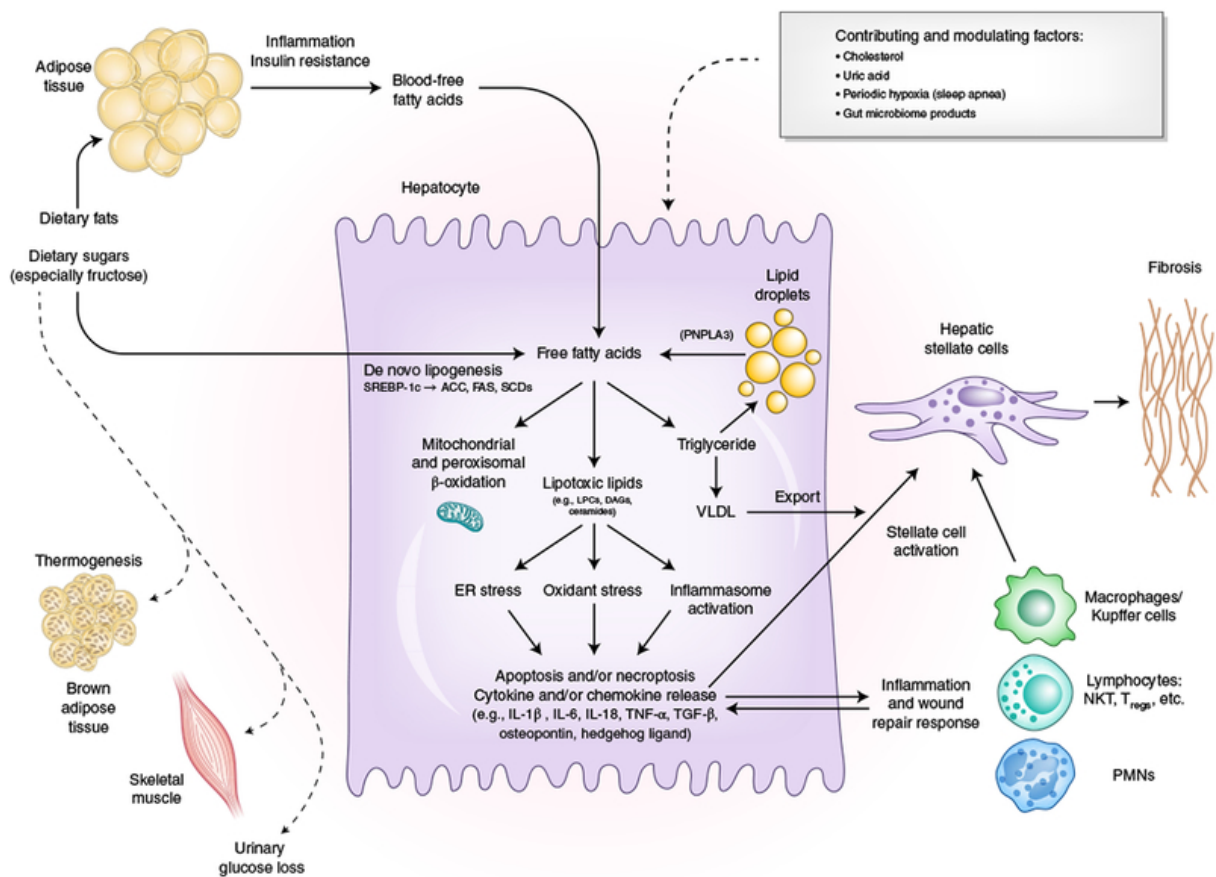
Na população geral dos países ocidentais a incidência de EHNA é de 20-30%. A distribuição mundial resultante de estudos de meta-análise conduzidos dentre os anos de 2005-2015 apresentou prevalência de 11-46% na América do Norte; 27-35% na América do Sul; 4-49% na Europa; 15-44% na Ásia e 9-20% na África. Estes valores são muito mais elevados em algumas situações específicas, sendo 90% de prevalência em indivíduos obesos e 50% em indivíduos com diabetes tipo 2 (VALLEJO *et al.*, 2022).

A EHNA é caracterizada pelo acúmulo de triacilgliceróis (TGs) no parênquima hepático, com aumento de até 5% do peso hepático em indivíduos que não consomem quantidade superior a 30 g de álcool diariamente para homens e 20 g para mulheres, respectivamente. O quadro patológico pode variar de uma simples esteatose, com excessivo acúmulo de gordura hepática, até as formas mais graves, incluindo a esteatohepatite não alcoólica (NASH) que pode progredir para fibrose ou hepatocarcinoma (MANNE; HANDA; KOWDLEY, 2018; NASCIMBENI *et al.*, 2013; PERVEEN *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2022).

A patogênese da EHNA é multifatorial e não completamente elucidada. Uma das hipóteses aventada em 1988, foi a conhecida por “teoria dos dois *hits*” (DAY; JAMES, 1998), na qual o primeiro *hit*, ou evento, seria o acúmulo de gordura hepática e o segundo a progressão para um quadro de inflamação e fibrose. Contudo, atualmente a teoria dos múltiplos *hits* tem sido mais aceita e implica em um conjunto de fatores atuantes de maneira sinérgica e paralela, considerando também a predisposição genética como um fator adicional (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; CHANG *et al.*, 2022), conforme ilustra a **Figura 1**. Na evolução do quadro temos a progressão da

esteatose simples com acúmulo de gordura hepática para o NASH em processos sequenciais. A lesão nos hepatócitos ocorre especialmente em quadros inflamatórios, o que pode resultar em morte celular, inflamação local e fibrogênese. Adicionalmente, este quadro pode ocorrer em paralelo a vários eventos fisiológicos como resistência à insulina (RI), desregulação da secreção de adipocinas, desequilíbrio nutricional e influência da microbiota intestinal, bem como fatores genéticos e epigenéticos (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018).

Figura 1 – Modelo de dano hepático por sobrecarga de substratos na patogênese da EHNA



Fonte: Riedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2018 Jul;24(7):908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29967350; PMCID: PMC6553468

Ácidos graxos livres são fundamentais para a patogênese da NASH. Os ácidos graxos livres que se originam da lipólise de triglicerídeos no tecido adiposo são entregues através do sangue ao fígado. O outro principal contribuinte para o fluxo de ácidos graxos livres através do fígado é o DNL, o processo pelo qual os hepatócitos convertem o excesso de carboidratos, especialmente a frutose, em ácidos graxos. Os dois principais destinos dos ácidos graxos nos hepatócitos são a beta-oxidação mitocondrial e a reesterificação para formar triglicerídeos. Os triglicerídeos podem ser exportados para o sangue como VLDL ou armazenados em gotículas lipídicas. O triglicerídeo de gotícula lipídica sofre lipólise regulada para liberar os ácidos graxos de volta ao pool de ácidos graxos livres dos hepatócitos. O PNPLA3 participa desse processo lipolítico, e uma

variante de nucleotídeo único do PNPLA3 está fortemente associada à progressão da NASH, ressaltando a importância da regulação dessa lipólise. Quando a eliminação de ácidos graxos através da beta-oxidação ou formação de triglicerídeos é sobrecarregada, os ácidos graxos podem contribuir para a formação de espécies lipotóxicas que levam ao estresse do RE, estresse oxidativo e ativação do inflamassoma. Esses processos são responsáveis pelo fenótipo da NASH com lesão hepatocelular, inflamação, ativação de células estreladas e acúmulo progressivo de excesso de matriz extracelular. Modificações no estilo de vida que incluem hábitos alimentares saudáveis e exercícios regulares reduzem a sobrecarga de substrato por meio da diminuição da ingestão e desvio de substratos metabólicos para tecidos metabolicamente ativos e podem, assim, prevenir ou reverter a NASH. SCD, esteroil CoA-dessaturase; FAS, ácido graxo sintase; NKT, célula T natural killer; Tregs, células T reguladoras; PMNs, leucócitos polimorfonucleares. Crédito: Marina Corral Spence/Springer Nature.

A homeostase lipídica hepática é fortemente controlada por um complexo sistema de vias de sinalização e transcrição, reguladas por hormônios e receptores nucleares, com a sinalização da insulina desempenhando papel fundamental (HARDY *et al.*, 2016). Da mesma maneira, a sinalização da insulina tem papel central no desenvolvimento da esteatose. A obesidade e a RI nos hepatócitos resultam na falha da supressão da lipólise, estresse nos adipócitos e recrutamento e infiltração por macrófagos no tecido adiposo, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), quimioatratante de monócitos (MCP-1), resistina e plasminogênio (PAI-1) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018).

O acúmulo de TGs é o estágio inicial da fisiopatologia da EHNA e resulta em desequilíbrio entre a síntese e a utilização de TGs, sendo o gatilho para a patologia. A dieta hiperlipídica e a lipogênese *de novo* são duas fontes que contribuem para o acúmulo de gordura hepática. O prejuízo na sinalização de insulina no tecido adiposo e no fígado parece ser muito precoce. Em pacientes obesos e diabéticos do tipo 2, a RI inibe a lipólise no tecido adiposo, resultando em fluxo excessivo de ácidos graxos não esterificados no fígado. A síntese de ácidos graxos hepáticos é um processo catalisado por duas enzimas diferentes: a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS). Estas são controladas em nível transcricional pela ativação pela insulina da proteína de regulação ao elemento regulador de esteroil 1C (SREBP-1c) e pela ativação pela glicose de proteínas de ligação ao elemento responsivo à carboidrato (ChREBP). Ambos estes fatores de transcrição são controlados pelo receptor X hepático (LXR). Este também regula as respostas induzidas diretamente pela ACC e FAS. A síntese *de novo* de ácidos graxos é aumentada em pacientes com EHNA devido à

coexistência de hiperinsulinemia e ingestão excessiva de açúcares, como a frutose (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; CHA; REPA, 2007; KAWANO; COHEN, 2013).

A beta-oxidação de ácidos graxos hepáticos ocorre nas mitocôndrias, peroxissomos ou microsossomos, resultando em produção energética importante. Os ácidos graxos de cadeia longa são transportados na membrana mitocondrial pela carnitil palmito transferase 1 (CTP1), que é inibida pelo malonil -COA e pela insulina, e é ativada pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissomo alfa (PPAR-alfa). O papel das mitocôndrias na EHNA ainda não está claro, mas alguns estudos têm demonstrado aumento ou redução na taxa de beta-oxidação, enquanto outros demonstram sua deficiência na progressão de EHNA para NASH (SIMÕES *et al.*, 2018).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidas pelo metabolismo celular normal. O acúmulo de gordura hepática pode levar à superprodução de radicais livres, que, uma vez não contrabalanceada pelas defesas antioxidantes, levam ao estresse oxidativo observado na progressão EHNA. Contudo, o estresse oxidativo em pacientes com NASH pode resultar em comportamento pró-oxidativo e consequente formação de moléculas altamente reativas, incluindo produtos da peroxidação lipídica como o malonaldeído (MDA) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; CHA; REPA, 2007; KAWANO; COHEN, 2013; J EZHILARASAN; LAKSHMI, 2022).

## 1.2 Papel da dieta na esteatose

Diversos tratamentos dietoterápicos têm sido empregados na prevenção ou no tratamento da EHNA, podendo ser associados com nutrientes específicos. O **resveratrol (RVS)**, um composto polifenólico encontrados em alguns alimentos, pode contribuir para redução de componentes da EHNA, assim como o ômega-3, já bastante elucidado nesta patologia. (CHARYTONIUK *et al.*, 2017; HAJIGHASEM; FARZANEGI; MAZAHERI, 2018).

A frutose destaca-se entre os açúcares simples e está presente em grandes quantidades em bebidas açucaradas e alimentos industrializados, cujo consumo é associado com o desenvolvimento de EHNA, conforme demonstrado por diferentes estudos. Atualmente, a ingestão de açúcares de adição corresponde a 15% da energia total das dietas ocidentais, sendo maior entre jovens e adolescentes. O consumo de frutose aumentou acentuadamente nos últimos anos, paralelamente ao consumo da

sacarose. A frutose propicia a lipogênese por meio da ativação de enzimas lipogênicas como a ACC, a FAS e a estéril-CoA desaturase (SCD1), bem como do bloqueio da beta-oxidação, levando ao acúmulo de gordura hepática, conforme evidenciado em estudos em modelos experimentais e clínico ((BASARANOGLU; BASARANOGLU; BUGIANESI, 2015; LANASPA *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2010; RONCAL *et al.*, 2018).

Em adição ao consumo de frutose/sacarose, a elevada ingestão de gorduras, particularmente as saturadas, tem contribuído para a patogênese da EHNA (JIMENEZ *et al.*, 2002; NEUSCHWANDER-TETRI BA, 2013; LIM *et al.*, 2010; JENSEN., *et al.*, 2018). Evidências experimentais sugerem que a qualidade, e não a quantidade, exerce papel determinante para a progressão da EHNA (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018). Em contraste aos ácidos graxos saturados (SFA), a alta ingestão de ácidos graxos poli-saturados (PUFAs) tem demonstrado inibir o desenvolvimento da esteatose. Diferentemente dos carboidratos, os PUFAs ômega-3 e ômega-6 diminuem a lipogênese por meio da inibição da SREBP1-C e de outros genes envolvidos na lipogênese. Adicionalmente, em especial os PUFA ômega-3 têm demonstrado ação regulatória sobre o PPAR $\alpha$ , aumentando a degradação de ácidos graxos. Siddiqui *et al.*, 2015 em seu estudo *in vivo* com diferentes óleos vegetais demonstraram que o teor total de ácidos graxos insaturados presentes nas formulações lipídicas é mais importante que o ácido graxo isolado na inibição da EHNA (BELLANTI *et al.*, 2017; KONUMA *et al.*, 2015; LEVY; CLORE; STEVENS, 2004; SIDDIQUI *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a disbiose intestinal, resultante do desequilíbrio dietético, contribui para o acúmulo de gordura hepática e para a patogênese de EHNA. Nesse sentido, a microbiota intestinal pode influenciar a absorção de energia, fermentando o amido resistente e os polissacarídeos, originando ácidos graxos de cadeia curta, especialmente o acetato, o propionato e o butirato, que se tornam absorvíveis pelo epitélio intestinal (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; STEFAN; HÄRING; CUSI, 2018).

### **1.3 Alternativas de prevenção/progressão da EHNA**

O RVS é apontado como candidato para prevenção e tratamento de diversas doenças, incluindo a obesidade associadas a condições tais como a EHNA. Este polifenol pode ser encontrado em diferentes alimentos de origem vegetal, dentre eles, uvas, bagas e amendoim. O RVS apresenta dois isômeros: *cis* e *trans*, sendo o segundo utilizado pelos pesquisadores por ser mais estável e reativo. Diversos estudos

sugerem suas atividades farmacológicas nos sistemas neuronal, cardiovascular e hepático. Atividades antitumorais, anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes também têm sido reportados (BAUR; SINCLAIR, 2006; CHARYTONIUK *et al.*, 2017; CHANG *et al.*, 2020; HEEBØLL *et al.*, 2015; TEJADA *et al.*, 2021).

Os efeitos do RVS no metabolismo lipídico têm sido amplamente descritos, como a ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato alfa (AMPK $\alpha$ ) e da Sirtuina 1 (SIRT1) em modelos experimentais. Estes efeitos resultam numa série de reações metabólicas benéficas, incluindo a inibição da inflamação e do estresse oxidativo. Uma rede complexa envolvendo tanto AMPK como SIRT1, SREBP-1C, LXR modulam o metabolismo lipídico e de colesterol (ABBA *et al.*, 2015; HEEBØLL *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016). No fígado, a SIRT1 está envolvida no controle do metabolismo energético pela desacetilação e ativação de PGC-1 $\alpha$  e PPAR $\alpha$ , resultando no aumento da beta-oxidação. A ativação do PGC- $\alpha$  leva ao aumento da biogênese mitocondrial, aumentando o número de mitocôndrias no tecido hepático (CHARYTONIUK *et al.*, 2017; TEJADA *et al.*, 2021).

A suplementação com RVS aumenta a fosforilação da AMPK $\alpha$ , a qual se torna metabolicamente ativa e resulta na inibição do LXR, diminuindo assim a SREBP1C. Contudo, por atenuar a atividade do LXR, o RVS indiretamente reduz a síntese de ácidos graxos e lipogênese *de novo*, diminuindo o acúmulo de gordura intracelular, o que pôde ser demonstrado em estudos de avaliação histológica (CHARYTONIUK *et al.*, 2017; XIN *et al.*, 2013).

Além do metabolismo lipídico, o RVS atua na diminuição de fatores relacionados ao estresse oxidativo, evitando a progressão de esteatose benigna para EHNA. Os mecanismos conhecidos que levam à redução das ROS são mediados pela via SIRT1-FOXO1-MnSOD. SIRT1 interage com fatores transcricionais FOX, o que leva à produção das enzimas SOD, CAT e MnSOD. Desta forma, o RVS protege contra o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (CHARYTONIUK *et al.*, 2017).

Dentre os tratamentos que vêm sendo utilizados para a prevenção da esteatose destaca-se o uso de ômega-3 (DE CASTRO; CALDER, 2018). Conforme observado em nosso estudo anterior, o óleo de canola pode representar uma boa estratégia de baixo custo para a prevenção/progressão da EHNA, por atuar na redução da peroxidação lipídica (MANCA, CS *et al.*, 2023).

O óleo de canola é caracterizado pelo seu baixo nível de SFA (7%), substancial quantidades de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e PUFA, incluindo 61% de ácido oleico, 21% de ácido linoleico e 11% de ácido alfa linolênico (ALA).

#### 1.4 Justificativa do estudo

Faltam evidências que sustentem tratamentos dietoterápicos na prevenção de EHNA na população brasileira, tais como o uso de compostos antioxidantes isolados ou associados, como ômega-3 e resveratrol.

Resultados obtidos durante o desenvolvimento da dissertação de Mestrado intitulada “Efeitos de diferentes óleos vegetais no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57/BL alimentados com dieta hiperlipídica e rica em frutose” (Manca *et al.*, 2023) demonstraram que a modulação quantitativa/qualitativa da dieta preveniu o desenvolvimento da esteatose em camundongos C57/BL6. Este estudo *in vivo* demonstrou atenuação do dano hepático induzido por dieta hiperlipídica com frutose (HLF), por meio de melhora da função hepática e do metabolismo lipídico, com modulação favorável do estresse oxidativo. Ressalta-se que os achados mais interessantes foram observados com a utilização do óleo de canola, que é rico em ácidos graxos ômega-3. Estudos recentes têm demonstrado a eficácia de óleos ricos em ômega-3 na prevenção e tratamento da EHNA, assim como de compostos bioativos, ganhando ênfase o resveratrol. Contudo, são poucos os estudos que fazem a associação dos mesmos.

Tendo em vista a dificuldade do diagnóstico da EHNA, que incluem a ausência de sinais e sintomas, a baixa sensibilidade das enzimas hepáticas como indicadores da doença e a questionável necessidade de biópsia como padrão-ouro, estudos *in vivo* em modelos animais podem se prestar como uma forma adequada para investigação do efeito de modulação da dieta e sua associação com compostos bioativos no desenvolvimento da patologia. Dentre os marcadores passíveis de serem avaliados nestes modelos, ressaltam-se a análise histopatológica para caracterização da gotícula lipídica, as quantificações séricas e hepáticas de proteína e de ácidos graxos, glicemia, determinação das frações lipídicas, peroxidação lipídica e determinação do estresse oxidativo através da glutatona reduzida e atividade antioxidante pela determinação de vitamina E, além de análises de expressão gênica de genes envolvidos com metabolismo lipídico.

**Hipótese do estudo**

Diante do exposto, a hipótese deste estudo é a de que a suplementação de uma dieta hiperlipídica e rica em frutose com resveratrol, associado ou não ao óleo de canola, pode prevenir ou reduzir a progressão da esteatose hepática não alcoólica em modelo animal experimental.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito da modulação lipídica qualitativa e quantitativa da dieta, bem como de sua associação ao antioxidante resveratrol, na preservação do parênquima hepático e na taxa de progressão da esteatose em modelo experimental de EHNA.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar o perfil dos óleos e dietas utilizados no estudo;
- Avaliar o efeito da modulação lipídica da dieta associada ou não ao RSV na modulação da EHNA;
- Avaliar o efeito da modulação lipídica da dieta associada ou não ao RSV sobre o parênquima hepático;
- Avaliar o efeito da modulação lipídica da dieta associada ou não ao RSV sobre o perfil metabólico hepático;
- Avaliar o efeito da modulação lipídica da dieta associada ou não ao RSV sobre marcadores do estresse oxidativo;
- Identificar marcadores hormonais e inflamatórios séricos de progressão da doença hepática não alcoólica;
- Avaliar o perfil de expressão gênica de marcadores do metabolismo lipídico em tecidos-alvo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-FMRP-USP) em julho de 2018. O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA-FMRP sob o protocolo nº 129/2018.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados 72 camundongos C57/BL6, machos, com peso aproximado de 20 g. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, com livre acesso a água e ração, submetidos a ritmo de 12 horas de claro/escuro e temperatura igual a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram separados em 6 grupos de acordo com delineamento experimental, descrito a seguir.

#### 3.3 Delineamento experimental

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

1. **Grupo controle (CT, n=12):** dieta AIN – 93 com 7% de óleo de soja;
2. **Grupo controle canola com resveratrol (CTCN/RVS, n=12):** dieta AIN – 93 com 7% de óleo de canola + 2 g/kg/dia de resveratrol;
3. **Grupo hiperlipídica + frutose (HLF, n=12):** dieta com 50% de gordura saturada (banha de porco) + 20% de Frutose;
4. **Grupo hiperlipídica + frutose + RVS (HLF/RVS, n=12):** dieta com 50% de gordura saturada (banha de porco) + 20% de Frutose + 2 g/kg/dia de resveratrol;
5. **Grupo hiperlipídica + frutose + óleo de canola (HLF/CN, n=12):** dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) + 20% de Frutose + 25% de óleo de canola;

6. **Grupo hiperlipídica + frutose + óleo de canola + RVS (HLF/CN/RVS, n=12):** dieta com 25% de gordura saturada (banha de porco) + 20% de Frutose +25% de óleo de canola + 2 g/kg/dia de resveratrol;

As dietas utilizadas foram baseadas no preconizado pelo *American Institute of Nutrition*, para a alimentação de roedores em fase de crescimento (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). O amido e a sacarose foram substituídos pela frutose, totalizando 20% em todos os grupos estudados. As dietas hiperlipídicas são hipercalóricas, com aumento da porcentagem dietética de lipídeos, sendo a dieta do grupo óleo de canola modulada para 25% de gordura saturada e 25% do óleo vegetal. O RSV na forma de TRANS-resveratrol foi obtido da indústria PragSoluções Biotecnológicas com lote interno PURI006851, código de origem 440.500.000050 e fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O. O RSV foi administrado na quantidade de 2 g/kg da dieta, o equivalente à ingestão média diária de 200 mg/dia. A composição da dieta utilizada no estudo foi compilada por meio das informações fornecidas pelo fabricante Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brazil) para Vitaminas, Mix mineral, Colina e L-cisteína. Amido de milho, frutose, caseína e BHT foram obtidos através da Synth. Os respectivos óleos vegetais e banha utilizadas foram adquiridas em comércio local. Os dados da composição da dieta estão descritos na **tabela 1**.

Tabela 1 – Composição da dieta baseada na AIN-93 crescimento g/100 g da dieta, 2023

<b>Ingredientes</b>	<b>CTS</b>	<b>CTCN/RVS</b>	<b>HLF</b>	<b>HLF/RVS</b>	<b>HLF/CN</b>	<b>HLF/CN/RVS</b>
Caseína	20	20	20	20	20	20
Amido	53	53	0	0	0	0
Sacarose	10	10	0	0	0	0
Frutose	0	0	20	20	20	20
óleo de soja	7	0	0	0	0	0
Banha	0	0	50	50	25	25
óleo de canola	0	7	0	0	25	25
Resveratrol	0	2	0	2	0	2
Fibra	5	5	5	5	5	5
Mix Vitaminas	1	1	1	1	1	1
Mix Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
L- Cisteína	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

---

BHT, di-terc-butil metil fenol. CTS, grupo controle com óleo de soja; CT/RVS, grupo controle com óleo de canola + 2 g/kg/dia de resveratrol; HLF, – grupo hiperlipídica + frutose (50 % de banha); HLF + resveratrol, grupo hiperlipídica + frutose (50 % de banha) + resveratrol; HLF/CN, grupo hiperlipídica (25% de banha + 25% óleo de canola) + frutose; HLF/CN + RVS, (25% de banha + 25% de canola) + frutose + resveratrol.

Fonte: REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993

Os animais foram randomizados aleatoriamente em caixas contendo 2 animais. As dietas foram preparadas semanalmente. Os animais passaram por um período de adaptação da dieta hiperlipídica, a qual foi misturada na proporção de 1:1 (experimental:controle) e, após a primeira semana (7 dias), na proporção 2:1. A quantidade consumida foi aferida três vezes por semana, sendo calculada a média do consumo semanal e diário a partir do terceiro dia de aferição. O cálculo de ingestão energética foi realizado a partir da dieta ofertada. A taxa de eficiência da dieta (TED) expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso e é calculada de acordo com a fórmula:  $TED = [\text{média ganho de peso diário (g)}/\text{média de consumo de dieta diário (g)}]$  (KANG; AHN; LEE, 2005). O cálculo do consumo de RSV foi realizado considerando o valor de RSV em 1kg da dieta (2 g/kg) e o peso final do animal, sendo: a média de ingestão diária ÷ peso do animal = quantidade de resveratrol consumida diariamente em mg/kg/dia.

Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue e tecidos foram coletados, sendo que as amostras ficaram armazenadas a -20 e -80°C, respectivamente, para análises posteriores, exceto para análises histológicas que foram colocadas diretamente em formalina. Para análise histológica as amostras foram cortadas separadamente e imersas em formalina.

Os tecidos hepáticos, adiposo epididimal e retroperitoneal foram pesados imediatamente após a decapitação dos animais em balança analítica e armazenados para as análises posteriores. Foram computados os coeficientes do tecido hepático e dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal:  $CV = (\text{razão peso TECIDO}/\text{peso corporal}) * 100$ .

### **3.4 Análises quantitativas**

O desenvolvimento desta parte do estudo foi realizado no Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

### 3.4.1 Quantificação da composição dos ácidos graxos dietéticos utilizados no preparo das dietas

A análise dos ácidos graxos presentes nas dietas utilizadas bem como nos óleos e gorduras foi realizada a partir do método de Folch *et al.*, 1957, seguida por metilação. Os ésteres metilados de ácidos graxos foram separados por cromatografia gasosa (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany), em equipamento com auto-injetor AOC-20i (Shimadzu Europe) utilizando com uma coluna de sílica fundida de SP-2560 (100 m, 0,25 mm I.D, *film thickness* 0.20  $\mu\text{m}$ ). O gás hélio foi usado como carreador. Foi utilizado ar sintético para detecção de ionização em chama de 250 °C. Injeções foram realizadas em modo Split. O tempo de retenção dos ácidos graxos é determinado em comparação com o padrão externo (Supelco 37 component FAME Mix) (ANDREOLI *et al.*, 2007).

Foram utilizadas amostras de 50  $\mu\text{l}$  de óleo de Canola e Soja e 25  $\mu\text{l}$  de banha de porco, que foram colocadas em tubos de ensaio de 10 mL com tampa (GC-2014, (Shimadzu Europe) (ANDREOLI *et al.*, 2007). As amostras serão avaliadas em um equipamento com auto-injetor AOC-20i (Shimadzu Europe, Duisburg, Germany) sob as mesmas condições supracitadas para as amostras hepáticas.

### 3.4.2 Análises hepáticas

As concentrações hepáticas TGs e colesterol total (CT) foram avaliados por meio de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Vista Alegre, Brasil). A gordura hepática total foi extraída pelo método de Bligh e Dyer adaptado (1959).

### 3.4.3 Determinação de proteína hepática

As concentrações hepáticas de proteínas foram realizadas por kit comercial utilizando o método de biureto (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil). Para a análise em fígado, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato e retirada uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  e seguido o protocolo do kit.

#### 3.4.4 Determinação de hidróxidos lipídicos pela oxidação do ferro em xilenol laranja (FOX)

A concentração total de hidroperóxidos foi determinada pelo método da oxidação dos íons férrico na presença de xilenol laranja. Este método é baseado na oxidação do íon ferroso em íon férrico por vários tipos de peróxidos presentes no soro. Na presença do xilenol laranja, ocorre a síntese de um complexo xilenol-férrico de cor laranja cuja absorbância pode ser avaliada. Para a realização deste ensaio utilizou-se 100 µl de soro, aos quais foi acrescentado 1 ml do reagente de cor, composto por uma solução de xilenol laranja em metanol e sulfato ferroso diluído em ácido sulfúrico à 10 mM. Após o acréscimo do reagente de cor, as amostras foram deixadas em repouso e protegidas da luz por 30 minutos. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M-5, Molecular Advices) do sobrenadante a 560 nm.

#### 3.4.5 Peroxidação lipídica

Foi realizada determinação de peroxidação lipídica em tecido hepático. A peroxidação lipídica foi realizada pela metodologia de Gerard Monnier com algumas adaptações.

#### 3.4.6 Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) hepática

A glutathiona reduzida hepática foi quantificada segundo o método descrito por Sedlack e Lindsa (1986). Foram coletados 200 mg de fígado, posteriormente homogeneizados em *vortex* com 1 mL de solução tampão fosfato-salino, em gelo. Foram retirados 50 µl do homogenato e misturados a 400 µl de água deionizada e 100 µl TCA a 50% e 500 µl de solução tampão EDTA (0,02 M). Após 15 minutos com agitação ocasional do tubo, o mesmo foi centrifugado por 15 minutos (3000 g em temperatura ambiente) e 500 µl do sobrenadante foram separados. Ao sobrenadante foram acrescentados 500 µl de tampão TRIS (0,4M pH=8,9) e 25 µl de DTNB (0,01 M em metanol). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M-5, Molecular Advices) no comprimento de onda de 412 nm, 5 minutos após a adição do DTND, contra um branco com EDTA (0,02 M) em lugar do sobrenadante. A concentração foi calculada

utilizando-se uma curva padrão de GSH em EDTA (0,02 M) e os resultados foram expressos em mmol/g proteína hepática.

#### 3.4.7 Quantificação de vitaminas E hepática

As análises hepáticas de vitamina E (alfa-tocoferol) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), segundo método adaptado de Arnaud *et al* (1991). Para as análises foram utilizados: cromatógrafo Shimadzu modelo LC-20AT, coluna tipo C-18 (150 x 4,6mm - 5µm), detector UV-visível modelo SPD-20A, fase móvel composta por acetonitrila:diclorometano:metanol 7:2:1, velocidade de fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 292 nm. As concentrações foram determinadas por meio do uso de padrão externo e os resultados foram expressos em n/ml Gt.

Cerca de 200 µL de amostra foram homogeneizadas com 400 µL de etanol absoluto. Posteriormente foram adicionados 400 µL de n-hexano para extração. As amostras sofreram agitação em *vórtex* por 1 minuto, para posterior centrifugação (3000 rpm durante 10 min). O sobrenadante foi retirado, cerca de 200 µL, e seco ao fluxo de nitrogênio e logo em seguida foi injetado no HPLC nas condições adequadas.

#### 3.4.8 Análise hormonal e das adipocinas séricas

Esta etapa do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia com o auxílio técnico de Lívia Maria Cordeiro Simões-Ambrosio. As dosagens de resistina, leptina, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, PAI-I e insulina a partir do soro dos animais foram realizadas por imunometria utilizando-se a tecnologia Luminex por meio de kits Miliplex (Merck).

### 3.5 Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Departamento de Biologia Molecular e Bioagentes Patogênicos, também da FMRP-USP, em colaboração com a Profa. Dra. Mariana Kiomy Osako.

Os fragmentos de fígados foram coletados após a eutanásia dos animais e imediatamente imersos em frasco contendo formalina (10% em solução tamponada) (Sigma-Aldrich) por 16 horas. Após esse período, os tecidos foram desidratados, com

banhos de álcoois em concentrações crescentes (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) (Merck, São Paulo, SP, BRA) a cada 1 hora, seguidos por diafanização em três banhos de xilol (LabSynth, Diadema, SP, BRA) consecutivos de 1 hora cada e, após esses passos, os tecidos foram imersos em dois banhos de parafina (Merck), de 2 horas cada. Os tecidos foram incluídos em bloco de parafina e, posteriormente, submetidos a cortes de 5  $\mu\text{m}$  (Leica Biosystems, Germany). As secções foram coradas utilizando eosina e hematoxilina (H&E). As imagens histológicas foram capturadas em objetiva de 20x pelo microscópio Olympus BX61VS (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Um total de 5 imagens de cada animal foi capturado para quantificação de gotículas lipídicas no fígado. O *software* ImageJ foi utilizado para configurar as imagens para modo binário (8-bit) e ajustar um limite (*threshold*) de visualização, em que se destacam as gotículas lipídicas, seguido da quantificação da área correspondente à gotícula de gordura em porcentagem. A classificação histológica quanto ao escore de esteatose hepática não alcóolica foi realizada de acordo com Kleiner *et al* 2005.

### 3.6 Análise molecular

As análises de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Molecular do Departamento de Clínica Médica do FMRP-USP em colaboração com a Dra. Ana Carolina Bueno e o auxílio técnico da Dra. Renata Sicchieri Pugliesi.

#### 3.6.1 Extração do RNA

Logo após a retirada do tecido hepático, fragmentos de aproximadamente 10 mg de fígado foram aliquotados em criotubos de 2 mL, congelados sob nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de RNA.

O RNA total dos tecidos foi extraído utilizando-se o TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen), segundo protocolo do fabricante. A cada amostra foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio absoluto (temperatura ambiente), seguidos por 10  $\mu\text{L}$  de glicogênio (20 mg/mL) gelado. Os tubos foram agitados por 15 segundos, incubados em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados 14000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de Trizol homogeneizando bem com a pipeta. Depois mais 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio absoluto (tempera-

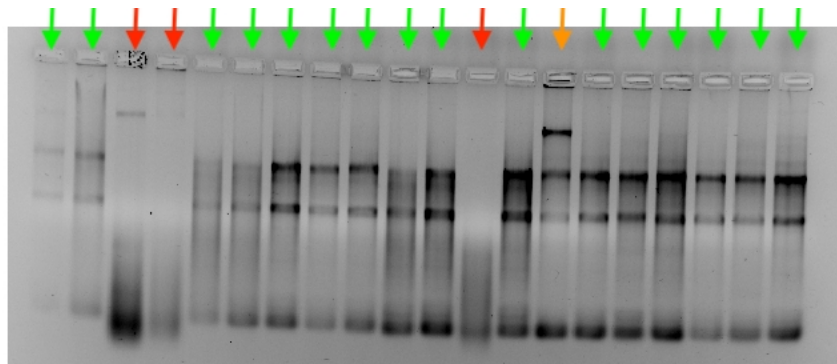


tura ambiente) logo em seguida agitação do tubo manualmente, mas uma centrifugação 14000 rpm por 15 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para o tubo novo e foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto gelado para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas no mínimo de 1:30 a 2:00 horas a -80 °C centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos, 4°C. O sobrenadante de isopropanol foi retirado e foram adicionados 1 mL etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos, 4°C e o etanol foi retirado. O *pellet* resultante foi deixado para secar levemente e, logo em seguida, foi ressuspenso em 12 µL de H<sub>2</sub>O DEPC e armazenado em freezer -80°C.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 260 nm. Também foram avaliadas as razões de absorbância 260/280 para a avaliação do grau de pureza, sendo utilizados aqueles cujas razões estavam entre 1,5 a 2,0.

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2% (**Figura 2**). Verificada a qualidade do RNA, este foi armazenado a -80 °C até a sua utilização para síntese de DNA complementar (cDNA). Amostras que apresentaram contaminação por DNA genômico foram tratados com a enzima DNase I (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 2 – Avaliação das amostras de RNA hepático em gel de agarose 1,2%.



As amostras de RNA total (2 uL) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2% para avaliação de sua integridade e contaminação por DNA genômico. As setas verdes indicam amostras adequadas para síntese de DNA complementar (cDNA). As setas laranjas indicam amostras íntegras, porém com contaminação de DNA genômico e que foram tratadas com DNase I previamente à síntese de cDNA. As setas vermelhas indicam amostras de RNA degradadas, que não utilizadas para a síntese de cDNA.

Fonte: Próprio autor

### 3.6.2 Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi obtido utilizando-se 500 ng de RNA de tecido hepático por meio do kit comercial na presença de transcriptase reversa e iniciador oligo (dt) *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* e a enzima MultiScribe (Applied Biosystems, Foster, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo do fabricante.

### 3.6.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para a quantificação relativa da expressão gênica por meio do equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System*, utilizando-se ensaios TaqMan® (Applied Biosystems) específicos, conforme descrito na **tabela 2**. Para tal, o cDNA foi diluído (1:5) em água DEPC para sua utilização nas reações de PCR, que foram feitas em duplicatas utilizando ensaios TaqMan™ específicos para cada gene-alvo (**tabela 2**), de acordo com o protocolo do fabricante.

A expressão relativa foi corrigida pelo gene codificador da beta-actina (*Actb*) que foi utilizado como controle endógeno baseado em artigo científico recente (FAN *et al.*, 2020). A quantificação relativa foi feita através do método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Genes-alvo marcadores do metabolismo lipídico avaliados no estudo

Gene-alvo	Identificação do nucleotídeo / proteína co-dificada (NCBI)	Ensaio TaqMan*
<i>Sirt1</i>	NM_001159589.1/NP_001153061.1	Mm01168521_m1
<i>Prkaa1</i> / AMPK	NM_001013367.3/NP_001013385.3	Mm01296696_m1
<i>Srebp-1a</i>	NM_011480.3/NP_035610.1	Mm00550338_m1
<i>Mlxipl</i> / ChREBP	NM_021455.4/ NP_067430.2	Mm02342723_m1
<i>Nr1h3</i> / <i>LXRa</i>	NM_008040.2/NP_032066.2	Mm00443451_m1
<i>Ppara</i>	NM_001113418.1/ NP_001106889.1	Mm00440939_m1
<i>Actb</i>	AKo75973.1	Mm00607939_s1

NCBI: National center for biotechnology information – National Institutes of Health  
\*Applied Biosystems-ThermoScientific

Fonte: National center for biotechnology information – National Institutes of Health

\*Applied Biosystems-ThermoScientific

### 3.6 Análise estatística

Os dados contínuos paramétricos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e suas médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados contínuos não-paramétricos foram apresentados em valores individuais e mediana, as quais foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Em todos os casos o nível de significância foi pré-fixado para  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composição percentual de ácidos graxos da banha e do óleo de canola utilizados para o preparo das dietas experimentais (%)

Entre as gorduras utilizadas, a banha de porco é rica em ácido oleico (n-9), que é o principal representante dos MUFAs. A mesma apresenta alto teor de SFAs, principalmente o mirístico (C14:0), o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0) e, por fim, é rica em PUFAs, com maior quantidade de ômega-6 (n-6).

Em relação aos óleos vegetais utilizados, o óleo de canola é rico em MUFAs — principalmente o ácido oleico (n-9). Estes são presentes em maior quantidade do que a de PUFAs, que apresentam maior quantidade de n-6, seguido de n-3, sendo rico em EPA e DHA. O óleo de soja apresenta baixa quantidade de SFAs, alta quantidade de n-6 e n-9 e é rico principalmente em PUFAs n-6, seguido de MUFAs (n-9). Apresenta uma quantidade considerável de n-3 e baixa quantidade de DHA.

Os dados estão representados na **tabela 3**.

Tabela 3 – Composição percentual da banha e óleos vegetais comerciais utilizados neste estudo, Ribeirão Preto, 2023.

<b>SFAs</b>	<b>BANHA</b>	<b>CANOLA</b>	<b>SOJA</b>
C4:0	0,135	0,111	0,116
C6:0	0,006	0,008	0,013
C8:0	ND	0,002	0,001
C10:0	0,068	0,015	0,000
C11:0	0,021	0,013	0,002
C12:0	0,089	0,020	0,007
C13:0	0,000	0,009	0,009
C14:0	1,418	0,074	0,006
C15:0	0,060	0,018	0,036
C16:0	23,860	4,502	0,008
C17:0	0,336	0,086	0,080
C18:0	10,886	2,290	0,357
<b>∑SFA</b>	<b>36,878</b>	<b>7,148</b>	<b>0,636</b>
<b>MUFAs</b>			
C16:1	1,962	0,293	11,565
C18:1n9c	36,924	60,007	23,153
C20:1n9	0,027	1,049	0,117
C22:1n9	0,024	0,028	0,028
<b>∑MUFAs</b>	<b>38,938</b>	<b>61,377</b>	<b>34,863</b>
<b>PUFAs</b>			
<b>C18:2n6c</b>	<b>20,688</b>	<b>19,729</b>	<b>57,519</b>
C18:3n6	0,055	0,826	0,000
C18:3n3	1,042	8,018	5,199
C20:2	0,117	0,041	0,035
C20:3n6	0,137	0,016	0,024
C20:3n3	0,997	1,111	0,596
C20:4n6	0,070	0,051	0,012
C20:5n3	0,016	0,332	0,422
C22:2	0,017	0,000	0,000
C22:6n-3	0,100	0,035	0,010
<b>∑PUFAs</b>	<b>23,241</b>	<b>30,159</b>	<b>63,818</b>
<b>n-6</b>	20,951	20,622	57,555
<b>n-3</b>	3,197	9,511	6,252
<b>Razão n-6/n-3</b>	6,553	2,168	9,205
<b>Razão SFAs/PUFAs</b>	1,59	0,24	0,01

Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais. SFAs: ácidos graxos saturados MUFAs: ácidos graxos monoinsaturados; PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados; n-3: ácidos graxos ômega-3; n-6: ácidos graxos ômega-6; ND: não determinado.

Fonte: Próprio autor

## 4.2 Índice de peroxidabilidade da banha de porco e dos respectivos óleos vegetais comerciais utilizados nas dietas experimentais

O índice de peroxidabilidade (IP) dos óleos vegetais, da gordura animal e das respectivas dietas experimentais utilizadas são apresentados nas **tabelas 4 e 5**.

O cálculo do IP é realizado de acordo com o grau de instaurações dos ácidos graxos. O óleo de soja é rico em PUFAs, especialmente n-6, o que contribui para o elevado IP (101,6). O óleo de canola é composto por elevado percentual de PUFAs, rico em ALA, EPA e DHA, o que contribuiu para o elevado IP encontrado (94,7). A gordura animal apresentou baixo IP (64,5), provavelmente por apresentar elevado percentual de SFA. O índice de peroxidabilidade (IP) das dietas apresenta uma maior concentração no óleo de soja e óleo de canola e menor concentração na banha de porco.

Tabela 4 – Índice de peroxidabilidade (IP) dos óleos e da gordura utilizados nas dietas experimentais

	Banha de porco	Óleo de canola	Óleo de Soja
<b>IP</b>	64,5	94,7	101,6
Índice de peroxidabilidade (IP) da gordura animal sem tratamento térmico. $IP = (\% \text{ monoenóicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienóicos} \times 1) + (\% \text{ trienóicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenóicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenóicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenóico} \times 8)$			

Tabela 5 – Índice de peroxidabilidade (IP) das dietas experimentais

	HLF	HLF/CN	CT/S
<b>IP</b>	64,5	79,6	83
Índice de peroxidabilidade (IP) da gordura animal sem tratamento térmico. $IP = (\% \text{ monoenóicos} \times 0,025) + (\% \text{ dienóicos} \times 1) + (\% \text{ trienóicos} \times 2) + (\% \text{ tetraenóicos} \times 4) + (\% \text{ pentaenóicos} \times 6) + (\% \text{ hexaenóico} \times 8)$			

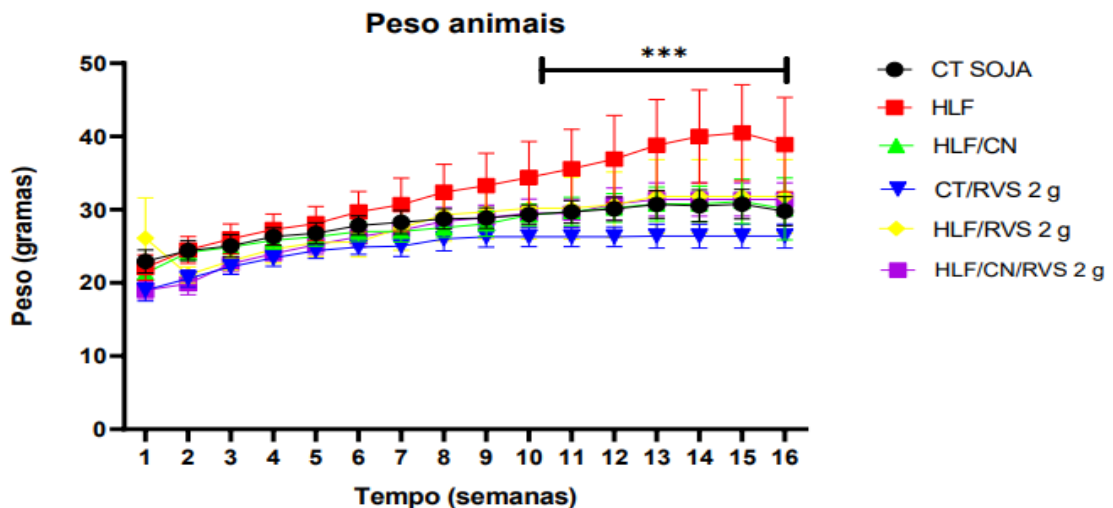
Fonte: Próprio autor.

## 4.3 Peso dos animais

O peso dos animais (g) foi aferido três vezes por semana durante as 16 semanas experimentais (**Figura 3**). Os grupos apresentaram diferenças significativas quando comparadas as médias de peso semanais ( $p < 0,0001$ ). Em relação ao peso inicial, os animais apresentaram diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) sendo que os grupos controle (CT), hiperlipídica com frutose (HLF) e hiperlipídica com frutose e canola (HLF/CN) iniciaram o experimento com peso maior do que todos os grupos experimentais suplementados com RVS: CTCN/RVS, HLF/RVS e HLF/CN/RVS. Ao

longo do experimento, o grupo HLF apresentou peso significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) do que os grupos-controle CTS e CTCN/RVS e do que os grupos tratados com dieta hiperlipídica e frutose HLF/CN, HLF/RVS e HLF/CN/RVS. O grupo CTCN/RVS apresentou menor de peso do que os grupos HLF/CN e HLF/RVS 2 g. Os animais tratados com óleo de canola e com RSV, bem como a associação de ambos, mantiveram ganho de peso gradual e homogêneo, que foi similar ao dos grupos CTS e HLF. Este último apresentou aumento de peso significativo em relação aos demais grupos, enquanto o grupo CTCN/RVS apresentou menor peso ao longo das semanas experimentais. O cálculo do ganho de peso ( $\Delta$ ) também evidencia maior ganho de peso do grupo HLF do que os grupos experimentais e menor ganho de peso no CTS e CTCN/RVS (Tabela 6).

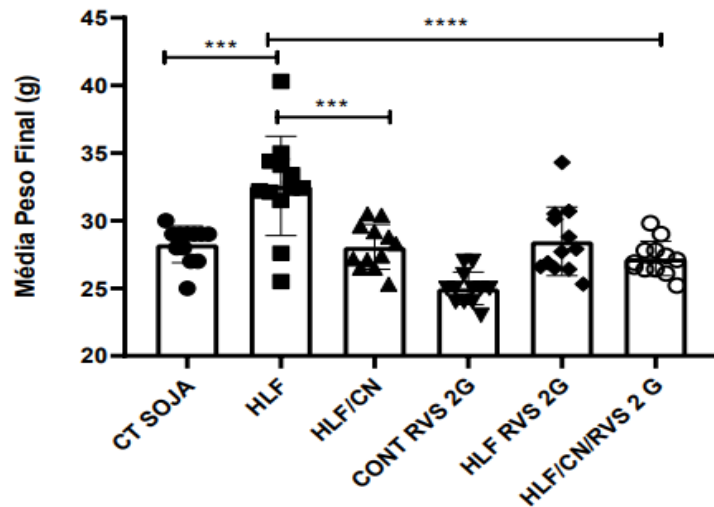
Figura 3 – Evolução do peso semanal dos animais ao longo das 16 semanas experimentais



**Evolução semanal do peso dos animais (g).** \*\*\* $p < 0,0001$  indica diferença significativa entre os grupos. CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

Fonte: Próprio autor

Figura 4 – Peso final dos animais ao final do experimento (g)



**Peso final dos animais (g).** \*\*\* indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

Fonte: Próprio autor.

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

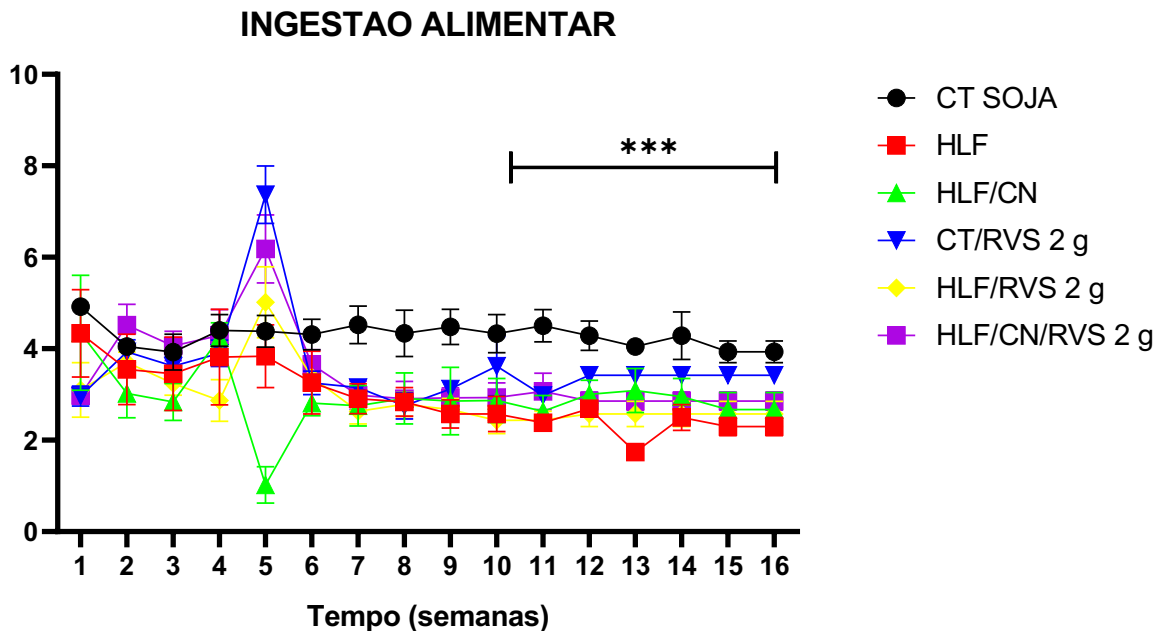
Na tabela 6 estão apresentados os dados de média  $\pm$  desvio padrão da média da ingestão alimentar semanal (g), ingestão energética (kcal/dia), taxa de eficiência da dieta (TED) e consumo de RVS dos animais durante o experimento, obtidos por uma média de 3 dias de consumo, média de ingestão do resveratrol em mg/dia considerando o peso final dos animais. Os animais passaram por adaptações da dieta de 1:1 e 2:1 da dieta regular do biotério (controle) para as respectivas dietas experimentais. Nas duas primeiras semanas de adaptação os houve diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre a ingestão do grupo CT ( $4,92 \pm 0,2$ ) e dos grupos experimentais CTCN/RVS ( $2,97 \pm 0,2$ ), HLF/RVS ( $3,1 \pm 0,62$ ) e HLF/CN/RVS ( $2,99 \pm 0,2$ ), na qual o CT apresentou uma ingestão maior do que os grupos que receberam a dieta com RSV. Na quarta semana experimental o grupo HLF/CN/RVS ( $2,87 \pm 0,5$ ) apresentou menor ingestão alimentar do que os demais grupos CT ( $3,98 \pm 4,8$ ), HLF/CN ( $3,87 \pm 4,6$ ) e HLF/CN/RVS ( $3,73 \pm 4,9$ ). Entre a 5ª e a 11ª semanas, o grupo CT ( $4,5 \pm 0,4$ ) apresentou maior ingestão alimentar do que os demais grupos HLF ( $2,37 \pm 0,2$ ), HLF/CN ( $2,5 \pm 0,23$ ), CTCN/RVS ( $2,99 \pm 0,18$ ), HLF/RVS  $2,43 \pm 0,22$ ) e HLF/CN/RVS



( $3,08 \pm 0,48$ ), enquanto o grupo HLF apresentou menor ingestão do que os grupos CTCN/RVS e HLF/CN/RVS. A partir da 11<sup>a</sup> semana, até o final do experimento, os animais do grupo CT ( $3,9 \pm 0,25$ ) e CTCN/RVS ( $2,3 \pm 0,21$ ) apresentaram maior ingestão do que os demais grupos: HLF, HLF/CN, HLF/RVS e HLF/CN/RVS. Em resumo, houve variações significativas na ingestão alimentar ao longo de todo experimento, sendo que o grupo CT e CTCN/RVS apresentaram maior ingestão alimentar, enquanto o grupo HLF e associações apresentaram menor ingestão alimentar.

Os resultados estão representados no apêndice A.

Figura 5 – Ingestão alimentar ao longo das semanais



**Ingestão alimentar ao longo das 16 semanas.** \*\*\* $p < 0,0001$  indica diferença significativa entre os grupos. CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

Fonte: Próprio autor.

Os dados de ingestão alimentar (g/semana) relacionam-se positivamente com os dados de ingestão energética (kcal/dia). As dietas experimentais com os respectivos óleos e RSV utilizados eram hipercalóricas quando comparadas com o grupo controle que recebeu AIN-93 para crescimento.

Em relação à ingestão energética (kcal/dia), não houve diferenças significativas entre grupos experimentais. A TED, que expressa a eficiência da dieta em propiciar ganho de peso, apresentou diferença significativa entre o grupo CT, com menor TED do que os grupos suplementados com RSV. O grupo HLF/RVS apresentou maior TED do que todos os grupos experimentais, A ingestão média de RVS, considerando o peso final dos animais, variou significativamente. Devido a maior ingestão diária, os grupos CT e CTCN/RVS apresentaram maior consumo de RSV/dia do que os grupos com dietas hiperlipídicas.

Tabela 6 – Peso inicial, peso final, ganho de peso, ingestão alimentar, ingestão energética, consumo diário resveratrol

	CTS	HLF	HLF/CN	CT/RVS	HLF/RVS	HLF/CN/RVS
Peso inicial (g)	21,8±1,5	20,8±1,5	21,1±1,0	18,9±1,3	18,6±1,3	18,6±1,3
Peso final (g)	30,3±0,9	39,5±5,9*	31,5±4,5**	26,6±2,3#	32,5±4,2***	31,3±2,3**
Δ ganho de peso(g)	8,5±1,5	18,5±4,8*	8,8 ±4,2#	7,3±1,9#	13,2±3,0#	13,8±2,2**
Ingestão diária (g/dia)	3,9±0,11	3,1±0,3***	3,0±0,3*	3,7±0,2##	3,1±0,35*	3,6±0,3#
TED	0,008± 0,01	0,02±0,01	0,02±0,0##	0,10±0,06*##	0,21±0,11*##\$	0,10±0,08***
Consumo diário RSV (mg/kg/dia)	0	0	0	281±22,4#	200±37,4***	232±29,4#

**MÉDIA ± DESVIO PADRÃO** \* P<0,05 em relação ao CTS; # p<0,05 relação ao HLF; \$ p<0,05 relação ao HLF/CN; \*\* p<0,05 relação ao CT/RVS; ## ##p<0,05 relação ao HLF/RVS e ###p<0,05 relação ao HLF/CN/RVS indicam diferença significativa entre os grupos (P<0,001). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

Fonte: Próprio autor.

#### 4.5 Peso dos tecidos hepático, adiposo epididimal e retroperitoneal e suas razões em relação ao peso corporal

Após a eutanásia, o fígado e os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal foram retirados e pesados, e os respectivos valores encontram-se descritos na (tabela 7.).

O peso do fígado não diferiu entre os grupos. O tecido adiposo epididimal (TAE), foi significativamente maior no grupo HLF do que os nos grupos CTS, CT/RVS

e HLF/CN/RVS ( $p < 0,0001$ ). Do mesmo modo, o tecido adiposo retroperitoneal (TAR) no grupo HLF foi significativamente maior quando comparado a todos os demais grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ). O TAR dos animais do grupo CTCN/RVS foi menor do que o dos grupos HLF/CN, HLF/RVS e HLF/CN/RVS. A soma dos tecidos adiposos (epididimal e retroperitoneal) no grupo no HLF foi significativamente maior do que nos grupos CTS, CTCN/RVS e HLF/CN/RVS. O grupo CTCN/RVS apresentou a menor somatória dos tecidos adiposos entre os grupos.

A razão entre o peso hepático e o peso corporal (peso hepático / peso corporal\*100), ou coeficiente hepático, variou significativamente entre os grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ). O coeficiente hepático foi maior no grupo CTCN/RVS do que no CT/S. Ainda, o grupo HLF apresentou menor coeficiente hepático quando comparado aos grupos CT/RVS, HLF/RVS e HLF/CN/RVS.

O coeficiente do tecido adiposo epididimal (peso TAE / peso corporal\*100) apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), sendo o maior no grupo HLF do que nos grupos CTS, CTCN/RVS e HLF/CN/RVS ( $p < 0,001$ ). Do mesmo modo, o coeficiente do tecido adiposo retroperitoneal (peso TAR / peso corporal\*100) variou significativamente entre os grupos ( $p < 0,0001$ ), sendo maior no grupo HLF do que nos grupos CTS, CTCN/RVS e HLF/CN/RVS. O coeficiente da soma dos tecidos adiposos (soma dos tecidos adiposos / peso corporal\*100), também foi significativamente maior no grupo HLF do que nos demais grupos CTS, CTCN/RVS, HLF/RVS e HLF/CN/RVS.

Tabela 7 – Peso hepático, peso tecido adiposo epididimal e retroperitonial, somatória e razões em relação ao peso corporal (g)

	CTS	HLF	HLF/CN	CT/RVS	HLF/RVS	HLF/CN/RVS
Fígado (g)	0,88±0,31	1,16±0,31	0,98±0,08	1,13±0,13	1,15±0,13	1,13±0,13
Coeficiente hepático (%)	2,90±0,99	2,90±0,49	3,17±0,56	4,30±0,27*	3,70±0,58	3,0±0,35
Tecido adiposo epididimal (g)	0,58±0,08 <sup>#</sup>	2,16±0,53	1,24±0,32	0,58±0,08 <sup>#</sup>	1,33±0,73	0,95±0,65 <sup>#</sup>
Coeficiente TAE (%)	2,08±0,28 <sup>#</sup>	6,16±2,58	3,81±0,98	2,08±0,28	4,33±2,10	3,16±1,89 <sup>#</sup>
Tecido adiposo Retroperitonial (g)	0,27±0,10	0,80±0,17*	0,51±0,18 <sup>#</sup>	0,08±0,05 <sup>#</sup>	0,49±0,30 <sup>##</sup>	0,37±0,28 <sup>###</sup>
Coeficiente TAR (%)	0,91±0,28	2,25±0,75*	1,45±0,52	0,25±0,45 <sup>#\$</sup>	1,58±0,99 <sup>**</sup>	1,08±0,99 <sup>#</sup>
Soma Tec. Adiposos (g)	0,85±0,88	3,01±0,70*	1,75±0,60 <sup>**</sup>	0,67±0,09 <sup>#</sup>	1,93±1,06 <sup>**</sup>	1,33±0,91 <sup>#</sup>
Coeficiente soma dos tecidos (%)	2,83±0,81	7,59±1,23*	5,68±1,75	2,5±0,30 <sup>#</sup>	6,10±3,44 <sup>###</sup>	4,32±2,95 <sup>#</sup>

MÉDIA ± DESVIO PADRÃO \*  $P < 0,05$  em relação ao CTS; #  $p < 0,05$  relação ao HLF; \$  $p < 0,05$  relação ao HLF/CN; \*\*  $p < 0,05$  relação ao CT/RVS; ##  $p < 0,05$  relação ao HLF/RVS e ###  $p < 0,05$  relação ao HLF/CN/RVS indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

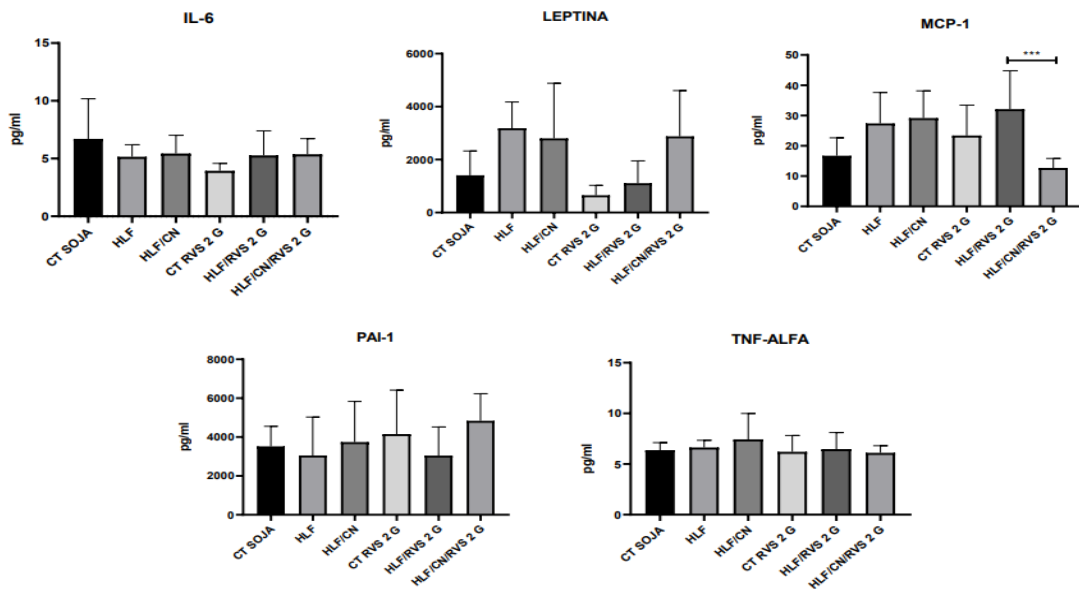
Fonte: Próprio autor.

#### 4.5 Parâmetros inflamatórios e hormonais

As concentrações médias das adipocinas nos grupos experimentais estão representadas na **figura 6**. Não houve diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais de IL-6, TNF- alfa, PAI-1 e leptina. A concentração média de MCP-1 foi significativamente maior no grupo HLF/RVS do que no HLF/CN/RVS ( $p < 0,05$ ).

O aumento de MCP-1 pode estar associado a um aumento de macrófagos infiltrados e conseqüentemente a um maior quadro inflamatório neste grupo, o que pode ser reduzido no grupo HLF/CN/RVS.

Figura 6 – Parâmetros Inflamatórios e hormonais



**Parâmetros hormonais e inflamatórios.  $P < 0,001$  \*\*\*** indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: IL-6: Interleucina 6. MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*; inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; TNF- alfa: fator de necrose tumoral.

Fonte: Próprio autor.

#### 4.6 Parâmetros antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

A peroxidação lipídica foi analisada por meio do MDA presente no tecido hepático e por meio do FOX, que se baseia na oxidação de  $Fe^{2+}$  (íon ferroso) em  $Fe^{3+}$  (íon férrico).

As análises de MDA hepático demonstraram que a peroxidação lipídica variou significativamente entre os grupos experimentais ( $p < 0,001$ , **Figura 7**). Os grupos que foram suplementados com RSV (CTCN/RSV e HLF/CN/RVS) apresentaram menor peroxidação lipídica do que os grupo CTS, HLF, e HLF/CN, sugerindo que o RSV exerce efeito inibidor da peroxidação lipídica. Já o grupo apresentou maior peroxidação lipídica quando comparado aos grupos suplementados com RSV. Estes dados corroboram com os resultados provenientes das análises de FOX, que demonstraram

maior peroxidação lipídica nos grupos CT e HLF do que nos grupos suplementados com RSV (CT/RVS, HLF/RVS e HLF/CN/RVS) ( $p < 0,0001$ , **Figura 7**).

As quantificações de GSH demonstraram diferença significativas entre os grupos suplementados com RVS ( $p < 0,0001$ ). O grupo HLF/RVS apresentou menor concentração de GSH do que os grupos associados ao óleo de canola: CTCN/RVS e HLF/CN/RVS (**Figura 7**), o que sugere um papel da CN no estado redox do tecido hepático dos animais.

A dosagem hepática de vitamina E demonstrou maior concentração no grupo HLF/CN do que no HLF/RVS, assim como no grupo HLF/CN/RVS do que nos grupos CTCN/RVS e HLF/CN.

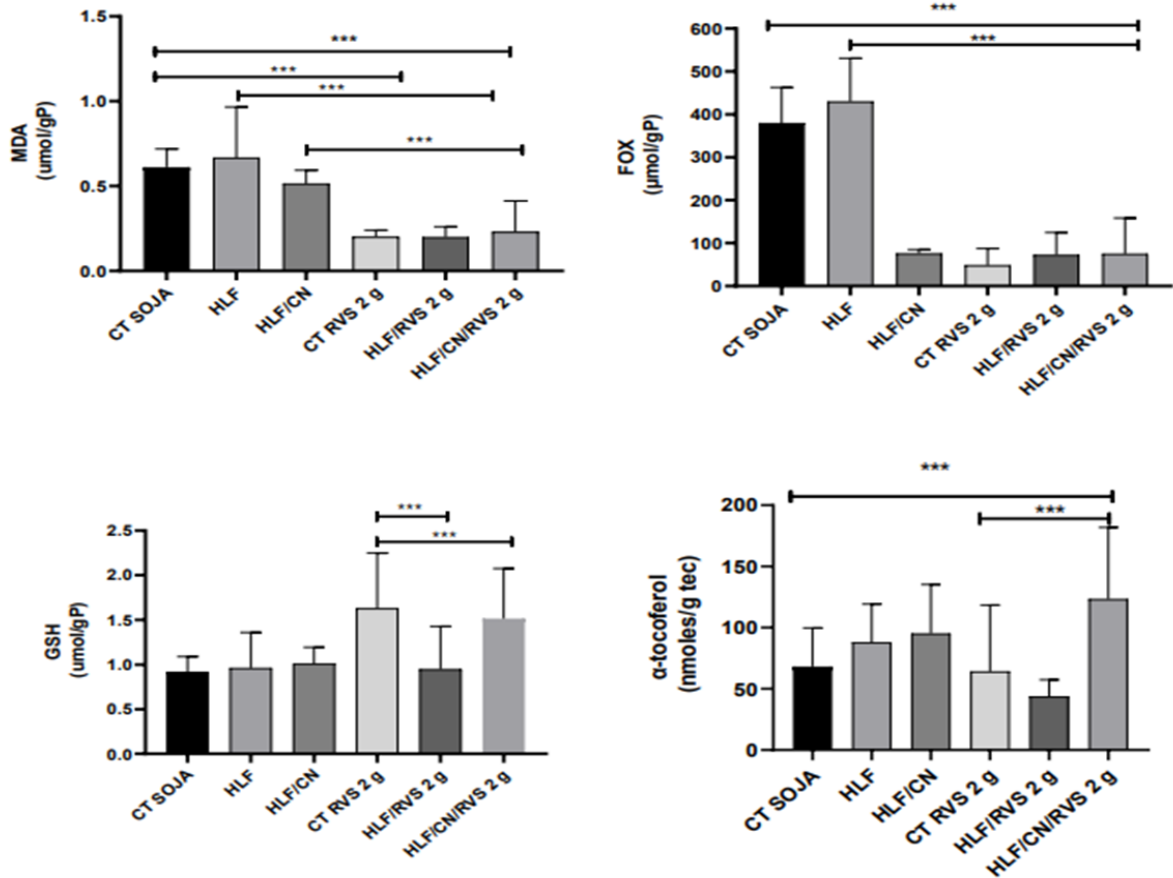
Tabela 8 – Valores hepáticos de MDA, GSH, FOX e Vitamina E nos diferentes grupos experimentais

	CTS	HLF	HLF/CN	CTCN/RVS	HLF/RVS	HLF/CN/RVS
MDA (mmol/ g PTN)	0,61±0,10	0,66±0,29	0,51±0,07	0,20±0,03	0,19±0,06	0,23±0,18
GSH (mmol/ g PTN)	0,91±0,17	0,96±0,39	1,01±0,18	1,6±0,61	0,94±0,48	1,5±0,56
FOX (µmol/g PTN)	379±83,2	430±100,8	75,9±9,26	48,7±38,6	72,8±51,9	75,3±82,8
Vitamina E (nmoles/g T)	68,1±31,6	88,0±31,2	95,2±40,2	64,2±54,07	43,7±13,6	123±58,4

MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \*  $p < 0,05$  em relação ao CTS; #  $p < 0,05$  relação ao HLF; \$  $p < 0,05$  relação ao HLF/CN; \*\*  $p < 0,05$  relação ao CT/RVS; ##  $p < 0,05$  relação ao HLF/RVS e ###  $p < 0,05$  relação ao HLF/CN/RVS indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: Adaptação: 2 semanas. Semana 1: Adaptação à dieta HL+1:1. Semana 2: Adaptação à dieta HL+2:1. Semana 3: Tratamento à dieta com óleos e resveratrol.

Fonte: Próprio autor

Figura 7 – MDA, FOX, GSH, Vitamina E nos diferentes grupos experimentais



Parâmetros hormonais e inflamatórios.  $p < 0,001$  \*\*\* indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: IL-6: Interleucina 6. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; TNF- alfa: fator de necrose tumoral

Fonte: Próprio autor.

#### 4.7 Gordura hepática total, triglicerídeos e colesterol hepáticos

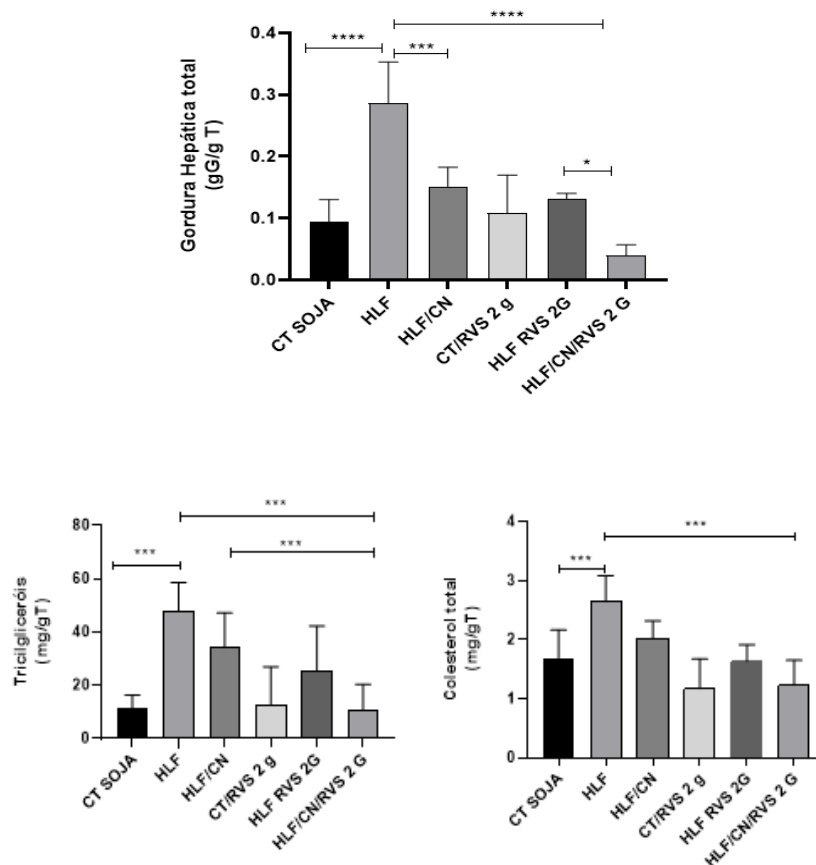
As análises de gordura hepática total demonstraram maior acúmulo de gordura no fígado dos animais do grupo HLF do que em todos os demais grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ). Este achado sugere que os tratamentos com CN, RSV ou ambos preveniram o acúmulo de gordura hepática. Ainda, o grupo HLF/RVS apresentou maior gordura hepática do que o HLF/CN/RVS ( $p < 0,01$ ), demonstrando um efeito protetor aditivo da CN.

As análises de colesterol total (CT) demonstraram que o grupo CT apresentou menor CT quando comparado aos grupos HLF e HLF/RVS ( $p < 0,001$ ). Ainda, o grupo

HLF/RVS apresentou maior acúmulo hepático de CT do que os grupos CT/RVS, HLF/CN e HLF/CN/RVS. O grupo CTS também apresentou menor acúmulo hepático de triacilgliceróis (TGs) do que os grupos HLF e HLF/CN. Os grupos HLF e HLF/CN apresentaram maior acúmulo hepático de TGs do que os grupos suplementados com RVS.

Os resultados supracitados estão representados na **Figura 8** abaixo.

Figura 8 – Gordura hepática total, triacilgliceróis, colesterol total



**Figura 8. Gordura hepática total, triacilgliceróis, colesterol total.  $P < 0,001$  \*\*\*** indicam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,001$ ). CT SOJA – grupo Controle; HLF – grupo Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. Início: IL-6: Interleucina 6. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; TNF- alfa: fator de necrose tumoral.

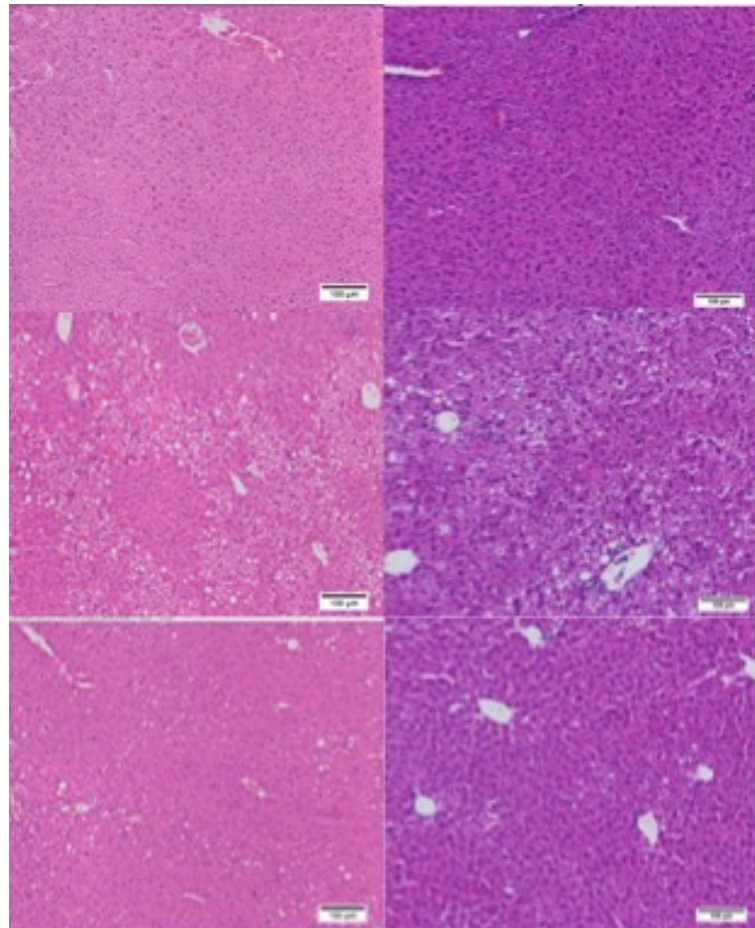
Fonte:

#### 4.9 Análise histopatológicas



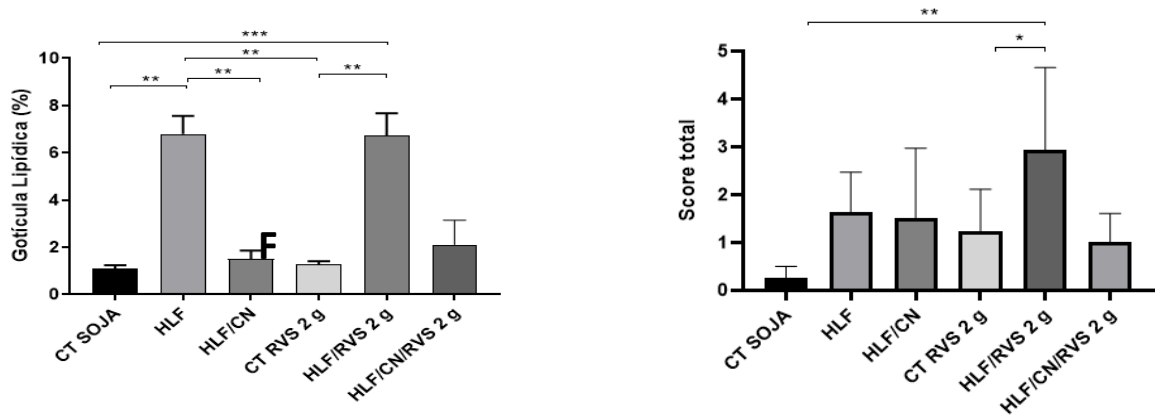
Os fígados foram corados com eosina e hematoxilina para a avaliação de esteatose hepática. A **figura 9** apresenta as microfotografias demonstrando os aspectos histológicos do tecido hepático dos animais experimentais. Observou-se diferença significativa entre o acúmulo de gotículas lipídicas entre os grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ), de forma que o mesmo foi maior no grupo HLF do que nos grupos CTS, HLF/CN e CTCN/RVS e, por outro lado, o mesmo foi menor no grupo CTS do que nos grupos HLF/RVS ( $p < 0,0001$ ) e HLF/CN/RVS ( $p < 0,01$ ). Ainda, observou-se menor acúmulo no grupo CTS/RVS do que nos suplementados com resveratrol: HLF/RVS e HLF/CN/RVS. O escore de esteatose foi maior no HLF/RVS do que nos grupos CTS, HLF e CTCN/RVS.

Figura 9 – Características histológicas do tecido hepático dos animais experimentais



Microfotografias mostrando aspectos histológicos de tecido hepático de animais do grupo Controle soja - CTS (A); Hiperlipídica + frutose- HLF (B); grupo Hiperlipídica 25 % banha e 25 % canola – HLF/CN (C); Controle com resveratrol – CT/RVS (D); Hiperlipídica 25 % com banha e 25 % com óleo de canola

e Resveratrol - HLF/RVS (E); Hiperlipídica com 25% de banha e 25% de canola + resveratrol - HLF/CN/RVS (F); e 10x – aumento original de 10x – aumento original de 40x.



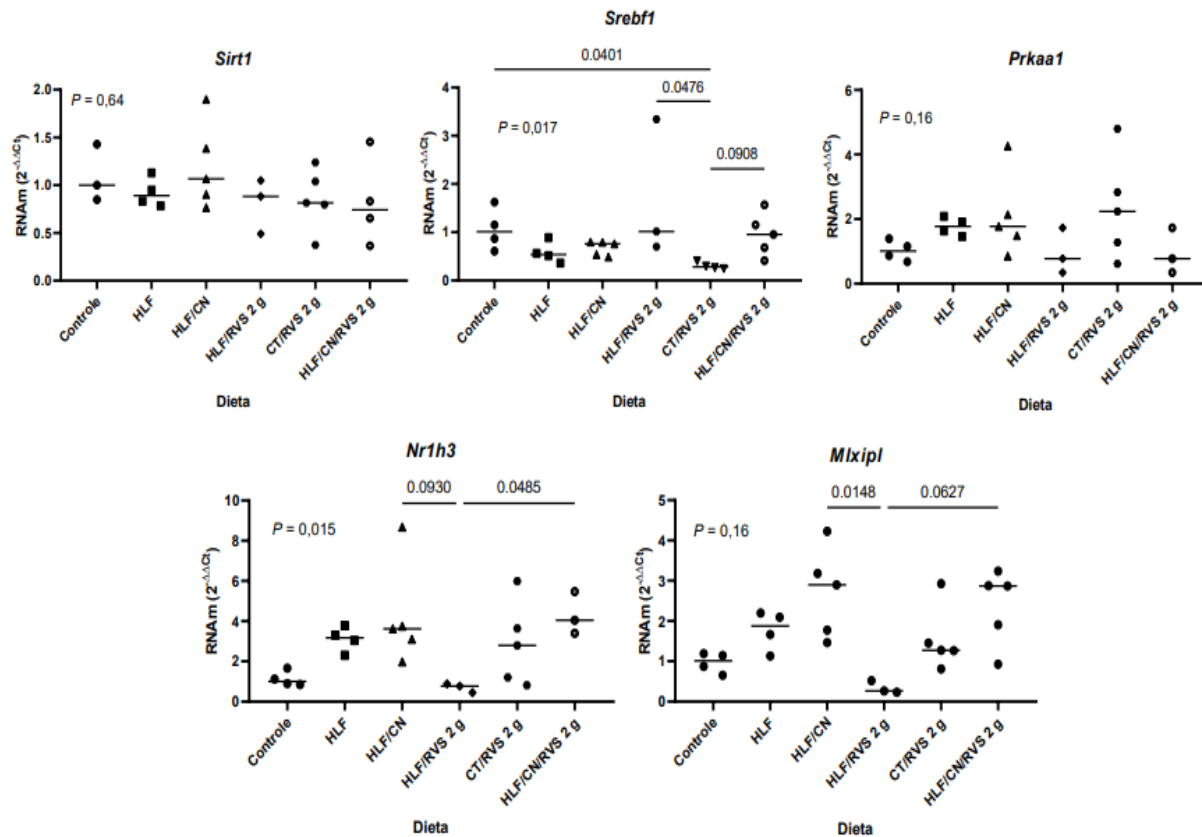
**Figura 9. Gotícula lipídica e score de esteatose.  $P < 0,001$  \*\*\*** Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol.

Fonte: Próprio autor

#### 4.10 Análise da expressão gênica relativa

Os resultados das análises de expressão gênica estão descritos nas tabelas apresentadas no **APÊNDICE 1** e sumarizados na **Figura 10**. Os mesmos não demonstraram diferenças significativas das medianas de expressão dos genes a *Sirt-1* e *Prkaa-1* entre os grupos experimentais. Já a expressão hepática do gene *Srebf1* variaram significativamente entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A mesma foi maior nos grupos CTS e HLF/RVS do que no CTCN/RVS. O gene *Nr1h3*, codificador do LXR-a, foi significativamente menos expresso no grupo HLF/RVS do que no HLF/CN/RVS ( $p < 0,05$ ).

Figura 10 – Genes envolvidos com metabolismo lipídico



**Figura 10. Genes metabolismo lipídico. P<0,001 \*\*\*** Hiperlipídica + frutose; HLF/CN- Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola; CT/RVS 2 g grupo controle com óleo de canola e com resveratrol; HLF/RVS 2 g grupo Hiperlipídica (50%) com Resveratrol 2 g e grupo HLF/CN/RVS 2 g Grupo 25 % de banha + 25 % de óleo de canola + 2 g de Resveratrol. SIRT 1: Sirtuina 1; SREBP: Sterol regulatory element-binding protein; Nr1h3: Lxr; Mlx1pl=ChREBP: carbohydrate-responsive element-binding protein;

Fonte: Próprio autor

## DISCUSSÃO

A EHNA vem sendo estudada e protocolos relacionados ao tratamento e prevenção da doença ainda não estão estabelecidos. Até o presente, diretrizes nacionais e internacionais incluem como protocolos de tratamento alterações no estilo de vida, farmacoterapia e tratamento cirúrgico.

Os extratos ricos em polifenóis, ou monômeros polifenólicos isolados de dietas, vêm recebendo grande atenção devido a suas várias propriedades biológicas, como melhora do metabolismo, inibição de processos inflamatório e estresse oxidativo e melhora do quadro de resistência insulínica (Yang *et al.*, 2022).

Os resultados encontrados no presente estudo referentes ao perfil de ácidos graxos presentes nos óleos utilizados e dietas utilizados são compatíveis com os achados na literatura científica. A banha de porco apresenta composição rica em ácido oleico (n-9), principal representante dos MUFAs. Ainda, tem alto teor de SFAs, principalmente o esteárico, o mirístico e o palmítico e, por fim, é rica em PUFAs, especialmente ômega-6 (n-6). A comparação entre os óleos de canola e soja demonstrou que o óleo de soja possui maior quantidade de PUFAs, sendo o mais abundante o n-6, seguido dos MUFAs, especialmente o n-9 (23,15%). O óleo de canola possui maior quantidade de MUFAs, sendo o n-9 o mais abundante, seguido de n-3, principalmente em EPA e DHA. A composição do óleo de soja é semelhante ao estudo de Siddiqui *et al.* (2016), enquanto que a composição do óleo de canola é semelhante ao trabalho de Lin *et al.* (2013). Dados comparativos entre a composição centesimal do óleo de soja e óleo de canola são representados por Costa *et al.* 2015.

A razão n-6/n-3 é diferente nos óleos utilizados, sendo a do de soja 9,2 e a do de canola 2,5, seguido da de banha de porco igual a 6,55. O índice de peroxidação dos óleos foi maior no óleo de soja, seguido pelo de canola e pela banha de porco, apresentado de acordo com o número de ligações insaturadas.

Os dados encontrados neste estudo demonstram que a razão n-6/n-3 não influenciou nos mecanismos de esteatose hepática. Siddiqui *et al.*, (2015) apresentou dados parecidos em um estudo comparativo com diferentes formulações lipídicas e que demonstra que a relação n-3/n-6 não apresenta relação com a esteatose hepática, porém demonstra que essas formulações têm quantidade similares de razão PUFAs/SFAs. O mesmo pode ser observado em um estudo por KAJIKAWA *et al.* (2009), o qual demonstra que a relação n-6/n-3 não influencia na EHNA.

As dietas ofertadas aos grupos CTS e CTCN foram isolocalóricas, enquanto que as demais foram hipercalóricas. O ganho de peso diferente dos animais era esperado. O grupo HLF apresentou aumento de peso crescente e maior ao longo das 16 semanas experimentais do os grupos controles. O grupo CTCN/RSV apresentou, conforme esperado, menor ganho de peso em relação aos demais de acordo com os estudos apresentados. Os grupos com dietas HLF com modulação de CN, CN/RSV (HLF/CN; HLF/RVS; HLF/CN/RVS) obtiveram ganho de peso menor do que o HLF, o que demonstra que a modulação da dieta foi efetiva na evolução do ganho de peso dos animais. Estudo similar recente corrobora com nossos dados, no qual camundongos C57/BL6 alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica receberam 50 mg/kg de RSV e outro grupo recebeu alta dose de RSV com 100 mg/kg. Os animais suplementados apresentaram menor peso do que os não-suplementados, demonstrando que ambas as concentrações de RVS foram capazes de atenuar o ganho de peso (DU *et al.*, 2021). Outro estudo semelhante utilizando diferentes óleos vegetais e dietas hiperlipídicas (Manca *et al.*, 2023) demonstrou eficácia do óleo de canola para ganho de peso. Os animais tratados com os respectivos óleos, como óleo de soja e canola mantiveram um ganho de peso gradual e homogêneo similar aos controles. Tais dados também foram evidenciados por Siddiqui *et al.*, 2015 em um estudo comparativo com diferentes formulações lipídicas ricas em n-9, n-7 e n-3 em esteatose em camundongos induzida por sacarose ou frutose.

Houve variação no consumo alimentar dos grupos durante o estudo, mas, conforme esperado, os grupos CT e CTCN/RSV apresentaram maior consumo do que os grupos com HLF. A TED da dieta foi maior nos grupos suplementados com RVS, em especial no HLF/RVS, o que demonstra que a dieta não foi capaz prevenir o ganho de peso neste grupo experimental. Izquierdo *et al.*, 2021 em seu estudo com suplementação de RSV (1 g/kg/dieta por 14 semanas) também demonstrou que a suplementação não foi eficaz na prevenção de ganho de peso. Não houve diferença entre a ingestão energética (kcal/dia) dos grupos estudados. Tendo em vista que o período experimental foi de 4 meses, o consumo alimentar e o crescimento dos animais refletem a boa adaptação dos animais às dietas ofertadas. Em relação ao consumo de RVS calculado por meio da média da ingestão diária, os grupos com dietas CTCN/RVS apresentou maior consumo, enquanto o grupo HLF consumiu uma menor quantidade em relação ao consumo diário.

Os pesos dos tecidos hepático, adiposos epididimal e retroperitoneal, bem como sua relação com peso corporal e soma dos tecidos adiposos foram estudados. O peso no fígado dos animais não demonstrou diferença significativa entre os grupos experimentais. Dados similares foram encontrados no estudo Chih-Chun Chang e colaboradores 2020, no qual foi realizada intervenção com suplementação com RVS por gavagem oral (1 mg/kg/dia) e não houve diferenças significativas no peso do fígado dos animais. Vários estudos em animais sugerem que ratos tratados com RVS com diferentes dosagens e tempos de administração mostram uma redução do peso e gordura hepática (Chih-Chun Chang *et al.*, 2023). Em relação ao TAE, conforme esperado, o grupo HLF teve um aumento significativo em relação aos demais grupos experimentais. Ding e colaboradores (2018) em seu estudo com camundongos C57/BL6 alimentados com dieta hiperlipídica e com dois parâmetros de administração de RVS (200 mg e 400 mg) demonstrou maior coeficiente de tecido adiposo abdominal e retroperitoneal no grupo HLF que nos demais, assim como nosso estudo. Contudo, o coeficiente do TAR não apresentou diferença entre os grupos que receberam RVS. Os achados do nosso estudo demonstraram menor peso do tecido adiposo retroperitoneal no grupo CTCN/RVS quando comparado aos grupos que receberam intervenção. O coeficiente do tecido adiposo epididimal foi maior no grupo HLF. Já o coeficiente do tecido adiposo retroperitoneal os grupos também apresentam diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) sendo HLF apresenta maior coeficiente de TAR em relação aos controles soja e RVS 2 e maior em relação HLF/CN/RVS. Já em relação a razão soma dos tecidos adiposos/ peso corporal o HLF apresentou um maior valor em relação ao CT soja sendo maior também em relação aos grupos CT/RVS 2 g, HLF/RVS 2 g e HLF/CN/RVS 2 g. Os polifenóis que são extraídos de plantas, como no caso do estudo o resveratrol pode demonstrar que é eficaz na redução do peso do tecido adiposo por ativar a SIRT-1, inibindo a ativação de NF- $\kappa$ B e expressão de genes inflamatório (SPRINGER, M.; MOCO, S, 2019).

A esteatose hepática não alcoólica caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado e como consequência como não tratada pode evoluir para esteatopatia, evoluindo para cirrose e hepatocarcinoma. É caracterizada por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução de antioxidantes, aumento das citocinas pró-inflamatórias. Alguns marcadores são utilizados para avaliação do acúmulo de gordura hepática como gordura hepática total, score de esteatose e gotícula de gordura (%)

bem como triacilgliceróis e colesterol hepáticos que no nosso estudo foram significativamente semelhantes os resultados, corroborando positivamente os dados. Em relação a gordura hepática total, o HLF apresentou um aumento significativo conforme já era esperado. O HLF/RVS apresentou um maior valor em relação ao grupo com HLF/CN/RVS, que quando comparado aos grupos que receberão somente canola e somente resveratrol foi significativamente maior. Para gotícula de gordura (%) o grupo controle soja e CT/RVS apresentaram um menor percentual quando comparado ao HLF e HLF/RVS. Os grupos tratados apresentaram uma menor porcentagem em relação ao HLF, exceto HLF/RVS 2 g. Os dados corroboram com o escore de esteatose em CT e CT/RVS apresenta um menor score em relação ao HLF/RVS. O grupo HLF/CN/RVS apresentou um melhor estágio preventivo de acúmulo de gordura hepática o que difere do grupo que recebeu apenas RVS na qual apresentou um maior score de esteatose e maior acúmulo de gotícula de gordura. Juan-Fen Mo e colaboradores em seu estudo com dieta hiperlipídica após 10 semanas com adição de resveratrol (100 mg/kg/dia) até a 14 semana de intervenção, o RVS protegeu contra o acúmulo excessivo de gordura hepática e melhorou perfil sérico de lipídeos (Juan-Fen Mo *et al* 2018). Chang e colaboradores 2020 em seu estudo com modelo animal com uma dosagem de 1 mg/kg/dia em dieta HFD não verificou redução do peso hepático e de gordura através da análise histológica. Manca e colaboradores demonstrou uma intervenção de 16 semanas com diferentes óleos vegetais comerciais e entre eles um grupo com mesma concentração do presente estudo, que demonstrou uma melhora no acúmulo do perfil lipídico com redução significativa através da análise histológica (Manca *et al.*, 2023). A suplementação com n-3 reduz o conteúdo de lipídeos, com aumento da resposta inflamatória e antioxidante além de melhorar a sensibilidade à insulina (BELLANTI *et al.*, 2017). Os ácidos graxos poli-insaturados inibem a lipogênese *de novo*, modulando assim a inflamação, estresse oxidativo, reações imunes, estresse do retículo endoplasmático, apoptose e necrose. Contudo os ácidos graxos que se acumulam nos hepatócitos durante o desenvolvimento da esteatose modulam o desenvolvimento e a progressão de NAFLD para NASH/cirrose (SIDDIQUI *et al*, 2015).

O RVS isolado no presente estudo não foi eficaz na prevenção da NAFLD, porém quando associado ao óleo de canola se mostrou eficaz. O metabolismo do resveratrol tem sido amplamente estudado em diversos modelos e estratégias experimentais que vão depender da dosagem, tempo de estudo e modelo utilizado. Uma vez que

o RVS entra no trato gastrointestinal ele sofre uma extensa biotransformação, sendo fornecida a diversos órgãos modificando sua biodisponibilidade e atividade. O mesmo possui baixa solubilidade em água, meia vida curta, metabolismo rápido e baixa taxa de absorção intestinal limitando sua absorção, que é um dos fatores que podem reduzir a sua eficácia. Estudos tem demonstrado que uma refeição rica em gorduras é capaz de inibir a absorção do resveratrol. Na última década tem sido estudado o encapsulamento do RVS como método para melhoria da biodisponibilidade, aumento a solubilidade e ganhando estabilização. O encapsulamento é formado por membrana lipídica. Estudos farmacocinéticos mostram que abordagem pode ser utilizada para proteger o RVS de degradação e controlar sua liberação (TEJADA *et al.*, 2021). Grande parte dos estudos recentes trazem o uso de resveratrol por gavagem, são poucos os estudos que trazem o RVS através da dieta.

A respeito do colesterol e dos triacilgliceróis hepáticos, houve aumento no grupo HLF quando comparado aos grupos tratados. Em relação aos TGs também o HLF conforme esperado apresentou uma maior quantidade o que demonstra que os tratamentos com canola e canola/resveratrol foram eficazes na redução de TGs hepáticos. O grupo HLF/CN apresentou um maior acúmulo quando comparado aos grupos que receberam resveratrol. Andrade *et al.*, 2014 demonstrou em seu estudo com modelo animal e recebendo 30 mg/kg/dia de resveratrol que o resveratrol foi eficaz na redução de CT e TGs. Em contraste aos ácidos graxos saturados, a alta ingestão de PUFAs tem demonstrado inibir o desenvolvimento da esteatose. Diferentemente dos carboidratos, os PUFAs ômega-3 e ômega-6 diminuem a lipogênese por meio da inibição da SREBP1-C e de outros genes envolvidos na lipogênese.

Contudo a qPCR revelou que a expressão gênica houve diferença significativa entre os grupos estudados, com maior expressão gênica do SREBP1C no CT, ou seja, o CT/RVS teve uma redução e uma superegulação no HLF/RVS. SREBP1 é um dos fatores de transcrição mais importantes por regular a lipogênese de novo no fígado, obtendo um papel importante na patogênese da NAFLD (GUANG-LI WANG *et al.*, 2009). SREBP e ChREBP são fatores transcricionais clássicos que regulam a lipogênese de novo por iniciar a transcrição de enzimas envolvidas com a lipogênese de novo (TIAN HUAJIE *et al.*, 2023). Ambos fatores transcricionais estão envolvidos com a regulação de enzimas como Acetil-COA carboxilase (ACC), Ácido graxo sintase (FAS).



Estudos recentes têm demonstrado que o resveratrol diminui o acúmulo de gordura hepática por ativar a SIRT1 e outros demonstram que o RVS pode atenuar a deposição de gordura por inibir a expressão da SREBP1C através da via SIRT-FOX. Além disso, ativadores químicos da SIRT1 inibem SREBP1C correlacionando com redução de níveis séricos de colesterol e lipídeos hepáticos (ANDRADRE *et al*, 2014). Contudo em nosso estudo, o HLF/RVS teve um aumento do fator de transcrição, aumentando a lipogênese de novo e conseqüente o acúmulo de gordura no fígado. Os dados são confirmados com gordura hepática total, % de gotícula lipídica, score de esteatose. O gene *Nr1h3/LXr* é considerado um sensor do metabolismo de colesterol e biossíntese de lipídeos. Com efeitos similares a SIRT1, LXr é envolvido com diferentes vias de sinalização celular por regular a produção de glicose, inflamação e lipogênese. Estudos recentes têm demonstrado que o RVS melhora a função hepática de ratos com NAFLD por aumentar a expressão de SIRT1, Fxr e LXr (Nour *et al.*, 2022). Em nosso estudo houve um aumento na expressão do LXr no grupo HLF/CN/RVS e uma redução no grupo HLF/RVS, os dados estão associados a outros achados como HLF/CN/RVS que obteve aumento, teve melhoras em parâmetros de gordura hepática, colesterol e triacilgliceróis hepáticos. Já para SIRT1 e PKA $\alpha$ 1 não houveram diferenças significativas entre os grupos estudados. MCP-1 encontrou-se aumentado no HLF/RVS, enquanto outros hormônios e fatores inflamatórios não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. A obesidade e a resistência insulínica nos hepatócitos resultam na falha da supressão da lipólise, estresse nos adipócitos e recrutamento e infiltração por macrófagos no tecido adiposo, com conseqüente liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), quimioatratante de monócitos (MCP-1), resistina e plasminogênio (PAI-1) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018).

Todos os fatores estudados contribuem para acúmulo de gordura hepática, a mesma pode trazer severas variações no fígado e alteração da morfologia dos hepatócitos, que pode trazer alteração da função e estresse oxidativo devido ao aumento da beta oxidação mitocondrial, aumento de mediadores inflamatórios e ativação de células imunes. No presente estudo, o estresse oxidativo foi verificado através da MDA, produto final da peroxidação lipídica, FOX produto final da oxidação de ferro e os antioxidantes que foram analisados foram GSH e a-tocoferol. Logo, o acúmulo de gordura hepática pode levar à superprodução de radicais livre não contrabalanceada pelas defesas antioxidantes, levando ao quadro de estresse oxidativo observado na

progressão EHNA. Contudo, o estresse oxidativo em pacientes com NASH pode resultar em comportamento pró-oxidativo com consequente formação de moléculas altamente reativas incluindo produtos da peroxidação lipídica, incluindo produto final como o malonaldeído (MDA) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; CHA; REPA, 2007; KAWANO; COHEN, 2013).

Logo, o acúmulo de gordura hepática pode levar à superprodução de radicais livre não contrabalanceada pelas defesas antioxidantes, levando ao quadro de estresse oxidativo observado na progressão EHNA. Contudo, o estresse oxidativo em pacientes com NASH pode resultar em comportamento pró-oxidativo com consequente formação de moléculas altamente reativas incluindo produtos da peroxidação lipídica, incluindo produto final como o malonaldeído (MDA) (ARAB; ARRESE; TRAUNER, 2018; CHA; REPA, 2007; KAWANO; COHEN, 2013). No caso do presente estudo os níveis de MDA e Fox foram menores nos grupos tratados, o que demonstra a alteração da dieta resultou em uma melhora expressiva nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e como consequência houve um aumento nos parâmetros antioxidantes, aumentando GSH e Vitamina E, sendo maior principalmente no grupo HLF/CN/RVS em relação ao CT/RVS. Cheng *et al.*, 2019 em seu estudo ministrando uma dosagem de 100 mg/kd/dia oralmente para os camundongos C57/BL apresentou melhoras de parâmetros de MDA e consequente aumento de GSH. Os dados corroboram com os achados em nosso estudo.

## 6 CONCLUSÕES

Dessa forma, retomando o objetivo do estudo que foi avaliar o efeito da modulação lipídica qualitativa e quantitativa da dieta, bem como de sua associação ao antioxidante resveratrol, na preservação do parênquima hepático e na taxa de progressão da esteatose em modelo experimental de EHNA. Temos que o modelo misto de dieta hiperlipídica e rica em frutose administrada por um período de 16 semanas foi eficiente na indução de esteatose hepática não alcóolica e algumas características da síndrome metabólica.

A modulação da dieta hiperlipídica e rica em frutose associada ou não ao antioxidante como forma de prevenção ou reversão de esteatose hepática não alcóolica se mostrou eficiente. Como parâmetros gerais houve manutenção do peso corporal dos animais que receberam o óleo de canola isolado ou resveratrol isolado ou ainda em associação de óleo de canola com resveratrol. A ingestão alimentar sofreu variações ao longo do experimento com os grupos controles com maior consumo. O resveratrol teve uma variação de ingestão em mg/kg/dia devido as variações de consumo.

O peso hepático não teve diferença entre os grupos, já o tecido adiposo epididimal (TAE) foi menor no grupo controle que recebeu resveratrol e também no grupo HLF/CN/RVS. Para o tecido adiposo retroperitoneal os grupos tratados apresentaram um menor acúmulo e o HLF/CN/RVS também apresentou um menor acúmulo quando comparado ao CT/RVS. A soma dos tecidos foi menor nos grupos HLF/CN, HLF/CN/RVS.

O acúmulo de gordura verificada através da histologia, gotícula de gordura e score de esteatose verificou que a intervenção com HLF teve um acúmulo de gordura e os grupos CTs apresentaram uma preservação do parênquima hepático. O HLF/RVS apresentou um maior acúmulo de gotícula de gordura e maior score de esteatose que pode estar relacionado com balonização e inflamação. Já o grupo com HLF/CN/RVS apresentou um menor score de esteatose, o que caracteriza que a associação do óleo de canola com resveratrol foi eficaz na prevenção do acúmulo de gordura hepática. Os dados são positivos quando relacionados com a expressão de genes envolvidos com metabolismo lipídico, com aumento da expressão do HLF/RVS de SREBPC1 que está relacionado com a lipogênese. Em relação aos TGs hepáticos, o mesmo foi maior nos grupos HLF e houve um aumento dos TGs no grupo canola

em relação ao HLF/CN/RVS e os dados corroboram com aumento da expressão gênica ChERB que está envolvido com a lipogênese *de novo* através de enzimas que envolvem o metabolismo lipídico.

Os parâmetros relacionados a estresse oxidativo apresentaram uma melhora em todos os grupos tratados.

Dessa forma, o uso de óleo de canola em associação com resveratrol parece ser uma alternativa interessante para prevenção/tratamento de esteatose em uma dieta rica estilo ocidental, visando ser uma alternativa de baixo custo e fácil aplicabilidade em pacientes com NAFLD, o que não ficou tão evidente em nosso estudo apenas com o canola e/ou resveratrol. Nosso estudo foi pioneiro na associação de óleo de canola com resveratrol, o que dificulta a comparação com outros estudos. Além de termos algumas limitações devido a ampla variedade de estudos com resveratrol incluindo diferentes dosagens, tempo de administração. Os dados do estudo são inéditos mostrando a eficácia da associação do óleo de canola com resveratrol na reversão do quadro esteatótico.

## REFERÊNCIAS

- ABBA, Y. *et al.* Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. **Advances in Virology**, v. 2015, n. Figure 1, 2015. Doi: 10.1155/2015/184241
- NOUR, A.; FARZANEGI, P.; JANI, M. A. A. Effects of Resveratrol Supplementation and Exercise on Apoptosis, Lipid Profile, and Expression of Farnesoid X Receptor, Liver X Receptor and Sirtuin 1 Genes in the Liver of Type 1 Diabetic Rats. **Medical Laboratory Journal**, v. 16; n. 4, 2022. Doi: 10.52547/Mlj.16.4.39
- ANDRADE, J. M.; PARAÍSO, A. F.; OLIVEIRA M. V. de *et al.* Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. **Nutrition.**, v. 30, p. 915-9, 2014. Doi: 10.1016/j.nut.2013.11.016.
- ARAB, J. P.; ARRESE, M.; TRAUNER, M. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, n. 1, p. 321-350, 2018. Doi: 10.1146/annurev-pathol-020117-043617
- BASARANOGLU, M.; BASARANOGLU, G.; BUGIANESI, E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: fructose as a weapon of mass destruction. **Hepato-biliary surgery and nutrition**, v. 4, n. 2, p. 109-16, 2015. Doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.05.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006. Doi: 10.1038/nrd2060.
- BELLANTI, F. *et al.* Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 173-185, 2017. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.023.
- BORRELLI, A. *et al.* Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. **Redox Biology**, v. 15, n. p. 467-479, Jan 2018. Doi: 10.1016/j.redox.2018.01.009.
- CHA, J. Y.; REPA, J. J. The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. **Journal of Biological Chemistry**, n. 1, v. 282, p. 743-751, 2007. Doi: 10.1074/jbc.M605023200
- CHANG, C. C.; CHANG, C. Y.; LIN, P. C.; HUANG, J. P.; CHEN, K. H.; YEN, T. H. *et al.* Administration of low-dose resveratrol attenuated hepatic inflammation and lipid accumulation in high cholesterol-fructose diet-induced rat model of nonalcoholic fatty liver disease. **Chin J Physiol.**, v. 63, p. 149-55, 2020. Doi: 10.4103/CJP.CJP\_43\_20
- CHARYTONIUK, T. *et al.* Alternative treatment methods attenuate the development of NAFLD: A review of resveratrol molecular mechanisms and clinical trials. **Nutrition**, v. 34, p. 108-117, 2017. Doi: 10.1016/j.nut.2016.09.001

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “Hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4 I, p. 842-845, 1998.

DE CASTRO, G. S.; CALDER, P. C. Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 37-55, 2018. Doi: 10.1016/J.CLNU.2017.01.006

EZHILARASAN, D.; LAKSHMI, T. A Molecular Insight into the Role of Antioxidants in Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, n. 1., p.15, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1155/2022/9233650>

DING, S. *et al.* Resveratrol reduces the inflammatory response in adipose tissue and improves adipose insulin signaling in high-fat diet-fed mice. **PeerJ.**, v. 6, e5173, Jun 2018. Doi: 10.7717/peerj.5173

REDA, D.; ELSHOPAKEY, G. E.; MAHGOUB, H. A.; RISHA E. F.; KHAN, A. A.; RAJAB, B. S.; EL-BOSHY, M. E.; ABDELHAMID F. M. Effects of Resveratrol Against Induced Metabolic Syndrome in Rats: Role of Oxidative Stress, Inflammation, and Insulin Resistance Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 13, 2022. Article ID 3362005.

DONGIOVANNI, P.; VALENTI, L. A nutrigenomic approach to non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017. Doi: 10.3390/ijms18071534.

DU, F.; HUANG, R.; LIN, D.; WANG, Y.; YANG, X.; HUANG, X.; ZHENG, B.; CHEN, Z.; HUANG, Y.; WANG, X.; CHEN, F. Resveratrol Improves Liver Steatosis and Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Association With the Gut Microbiota. **Front. Microbiol.** 12:611323, 2021. Doi: 10.3389/fmicb.2021.611323

GEORGE, E. S. *et al.* Practical Dietary Recommendations for the Prevention and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 30-40, 2018. Doi: 10.1093/ADVANCES/NMX007

GERARD-MONNIER, D.; ERDELMEIER, I.; REGNARD, K.; MOZE-HENRY, N.; YADAN, J. C.; CHAUDIERE, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. **Chem Res Toxicol.**, v. 10, p. 1176-83, 1998.

GUANG-LI, W.; YU-CAI, F.; WEN-CAN, X.; YA-QING, F.; SHI-RONG F.; XIAO-HUI, Z. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1–FOXO1 signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 380, n. 3, p. 644-649. Doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.163

HAJIGHASEM, A.; FARZANEGI, P.; MAZAHERI, Z. Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1-8, 2018. Doi: 10.1080/13813455.2018.1441872

HEEBØLL, S. *et al.* Effect of resveratrol on experimental non-alcoholic steatohepatitis. **Pharmacological Research**, v. 95-96, p. 34-41, 2015. Doi: 10.1080/13813455.2018.1441872.

HEEBØLL, S. *et al.* Effect of resveratrol on experimental non-alcoholic fatty liver disease depends on severity of pathology and timing of treatment. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 31, n. 3, p. 668-675, 2016. Doi: 10.1111/JGH.13151.

HOSSEINIA, H.; TEIMOURIA, M.; SHABANIA, M.; KOUSHKIA, M.; KHORZOUGHIA, R. B.; NAMVARJAHAN, F.; IZADIB, P.; MESHKANI, R. Resveratrol alleviates non-alcoholic fatty liver disease through epigenetic modification of the Nrf2 signaling pathway. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 119, 2020. Doi: 10.1016/J.BIOCEL.2019.105667

TIAN, H.; FANG, Y.; LIU, W.; WANG, J.; ZHAO, J.; TANG, H.; YIN, Y.; HU, B. Y.; PENG, J. Inhibition on XBP1s-driven lipogenesis by Qushi Huayu Decoction contributes to amelioration of hepatic steatosis induced by fructose. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115806>

IZQUIERDO, V.; PALOMERA-ÁVALOS, V.; PALLÀS, M.; GRINÁN-FERRÉ, C. Resveratrol Supplementation Attenuates Cognitive and Molecular Alterations under Maternal High-Fat Diet Intake: Epigenetic Inheritance over Generations. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 1. 453, 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22031453>

MO, J.; WU, A. J.; ZHENG, A. LI.; YU, A. Y.; ZHANG, B. T.; GUOA, C. L.; BAO, Y. Therapeutic efficacy of polydatin for nonalcoholic fatty liver disease via regulating inflammatory response in obese mice. **RSC Adv.**, v. 8, p. 31194-31200, 2018.

CHENG, K.; SONG, Z.; ZHANG, H.; LI, S.; WANG, C.; ZHANG, L.; WANG, T. The therapeutic effects of resveratrol on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice by improving oxidative stress, inflammation and lipid-related gene transcriptional expression. **Medical Molecular Morphology**, v. 52, p. 187-197, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00795-019-00216-7>

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434-441, 2013. Doi: 10.1007/S00535-013-0758-5

KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1.313-1.321, 2005. Doi: 10.1002/HEP.20701.

KONUMA, K. *et al.* Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using melanocortin 4 receptor-deficient mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015. Doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0121528

LANASPA, M. A. *et al.* Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: Potential role in fructose-dependent and -independent fatty

liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40.732-40.744, 2012. Doi: 10.1155/2020/6672636

LEVY, J. R.; CLORE, J. N.; STEVENS, W. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Hepatic Triglycerides in Fischer 344 Rats. **Hepatology**, v. 39, n. 3, p. 608-616, 2004.

LIM, J. S. *et al.* The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 251-264, 2010. Doi: 10.1038/nrgastro.2010.41

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n. 4, p. 402-408. 2001.

MANNE, V.; HANDA, P.; KOWDLEY, K. V. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 22, n. 1, p. 23–37, 2018. DOI: 10.1016/J.CLD.2017.08.007.

NASCIMBENI, F. *et al.* From NAFLD in clinical practice to answers from guidelines. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 4, p. 859–871, 2013. Doi: 10.1016/J.JHEP.2013.05.044.

PERVEEN, S. *et al.* A Systematic Machine Learning Based Approach for the Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Risk and Progression. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. Doi: 0.1038/s41598-018-20166-x

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RONCAL, C. *et al.* **HHS Public Access**. v. 68, n. 5, p. 1.063-1.075, 2018.

Riedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018 Jul;24(7):908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29967350; PMCID: PMC6553468

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.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 1, p. 192-205, 1968.



SILVIA, T.X.O, CATALINA M.M, MARGALIDA M.M, M MAGDALENA QUETGLAS-LLABRÉS· ANTONI PONS, JOSEP A TR, ANTONI, S. **Curr Pharm Des.** 2021;27(22):2558-2570. DOI: 10.2174/1381612826666200417165801.

TEJADA, S.; CAPÓ, X.; MASCARÓ, C. M.; MONSERRAT-MESQUIDA, M.; QUETGLAS-LLABRÉS, M. M.; PONS, A.; TUR, J. A.; SUREDA, A. Hepatoprotective Effects of Resveratrol in Non-Alcoholic Fatty Live Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 22, p. 2.559, 2021.

SIMÕES, I. C. M. *et al.* Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 95, n. October 2017, p. 93-99, 2018.

SPRINGER, M.; MOCO, S. Resveratrol and Its Human Metabolites-Effects on Metabolic Health and Obesity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 143, 2019.

STEFAN, N.; HÄRING, H.-U.; CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 0, n. 0, p. 1-12, 2018.

TIAN, Y. *et al.* Resveratrol supplement inhibited the NF- $\kappa$ B inflammation pathway through activating AMPK $\alpha$ -SIRT1 pathway in mice with fatty liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 422, n. 1-2, p. 75-84, 2016.

XIN, P. *et al.* Alleviative effects of resveratrol on nonalcoholic fatty liver disease are associated with up regulation of hepatic low density lipoprotein receptor and scavenger receptor class B type I gene expressions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 12-18, 2013.

YANG, K.; CHEN, J.; ZHANG, T.; YUAN, X.; GE, A.; WANG, S.; XU, H.; ZENG, L.; GE, J. Efficacy and safety of dietary polyphenol supplementation in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. **Front. Immunol.**, v. 13, p. 949746, 2022. Doi: 10.3389/fimmu.2022.949746

## ANEXO 1




## CERTIFICADO

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 acordo com 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 Ribeirão 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

**APENDICE A**

**Estatística descritiva**

<b>Actb - SREBP1C</b>						
	<b>Controle</b>	<b>HLF</b>	<b>HLF/CN</b>	<b>HLF/RVS 2 g</b>	<b>CT/RVS 2 g</b>	<b>HLF/CN/RVS 2 g</b>
Number of values	4	4	5	3	4	5
Minimum	0,6071	0,3622	0,4897	0,7022	0,2466	0,4132
25% Percentile	0,6722	0,4006	0,5147	0,7022	0,2514	0,5469
Median	1,01	0,5382	0,7605	1,014	0,2812	0,9559
75% Percentile	1,507	0,8068	0,7942	3,34	0,3787	1,361
Maximum	1,625	0,8888	0,7983	3,34	0,4061	1,569
Mean	1,063	0,5819	0,6756	1,686	0,3038	0,9543
Std. Deviation	0,4357	0,2216	0,1487	1,442	0,07124	0,443
Std. Error of Mean	0,2178	0,1108	0,06649	0,8323	0,03562	0,1981
Lower 95% CI	0,3697	0,2293	0,491	-1,896	0,1904	0,4043
Upper 95% CI	1,756	0,9344	0,8602	5,267	0,4171	1,504
Mean ranks	18,38	10	12,2	19,33	2,75	16,3

**Estatística descritiva**

<b>Actb -NR1H3 - LXRa</b>						
	<b>Controle</b>	<b>HLF</b>	<b>HLF/CN</b>	<b>HLF/RVS 2 g</b>	<b>CT/RVS 2 g</b>	<b>HLF/CN/RVS 2 g</b>
Number of values	4	4	5	3	5	3
Minimum	0,6795	1,456	0,8541	0,3421	0,6103	0,3421
25% Percentile	0,7269	1,501	1,171	0,3421	0,9435	0,3421
Median	1,01	1,771	1,775	0,7724	2,238	0,7724
75% Percentile	1,332	2,038	3,202	1,726	3,816	1,726
Maximum	1,392	2,081	4,265	1,726	4,798	1,726
Mean	1,023	1,77	2,104	0,9469	2,351	0,9469
Std. Deviation	0,3133	0,2788	1,296	0,7083	1,614	0,7083
Std. Error of Mean	0,1566	0,1394	0,5797	0,4089	0,7217	0,4089
Lower 95% CI	0,5244	1,326	0,4945	-0,8126	0,3475	-0,8126
Upper 95% CI	1,521	2,213	3,714	2,706	4,355	2,706
Mean ranks	8	15,75	16	7,5	16	7,5

<b>Actb - PPRa</b>						
	<b>Controle</b>	<b>HLF</b>	<b>HLF/CN</b>	<b>HLF/RVS 2 g</b>	<b>CT/RVS 2 g</b>	<b>HLF/CN/RVS 2 g</b>
Number of values	4	4	5	3	5	3
Minimum	0,6795	1,456	0,8541	0,3421	0,6103	0,3421
25% Percentile	0,7269	1,501	1,171	0,3421	0,9435	0,3421
Median	1,01	1,771	1,775	0,7724	2,238	0,7724
75% Percentile	1,332	2,038	3,202	1,726	3,816	1,726
Maximum	1,392	2,081	4,265	1,726	4,798	1,726
Mean	1,023	1,77	2,104	0,9469	2,351	0,9469
Std. Deviation	0,3133	0,2788	1,296	0,7083	1,614	0,7083
Std. Error of Mean	0,1566	0,1394	0,5797	0,4089	0,7217	0,4089
Lower 95% CI	0,5244	1,326	0,4945	-0,8126	0,3475	-0,8126
Upper 95% CI	1,521	2,213	3,714	2,706	4,355	2,706
Mean ranks	8	15,75	16	7,5	16	7,5

### Estadística descriptiva

<b>Actb - ChREBP</b>						
	<b>Controle</b>	<b>HLF</b>	<b>HLF/CN</b>	<b>HLF/RVS 2 g</b>	<b>CT/RVS 2 g</b>	<b>HLF/CN/RVS 2 g</b>
Number of values	4	4	5	3	5	5
Minimum	0,6529	1,133	1,464	0,2325	0,8123	0,9266
25% Percentile	0,7081	1,266	1,618	0,2325	1,039	1,416
Median	1,009	1,878	2,898	0,2643	1,275	2,868
75% Percentile	1,178	2,17	3,705	0,5176	2,191	3,058
Maximum	1,189	2,196	4,228	0,5176	2,928	3,238
Mean	0,9651	1,771	2,709	0,3381	1,547	2,363
Std. Deviation	0,2505	0,4839	1,118	0,1563	0,8077	0,9431
Std. Error of Mean	0,1253	0,242	0,4998	0,09023	0,3612	0,4218
Lower 95% CI	0,5664	1,001	1,321	-0,05011	0,5441	1,192
Upper 95% CI	1,364	2,541	4,096	0,7263	2,55	3,534
Mean ranks	7,25	15	20,4	2	12,8	18

## APENDICE B

27/02/2023, 23:50

ScholarOne Manuscripts

 Molecular Nutrition and Food Research

 Home

 Author

 Review

# Submission Confirmation

 Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Molecular Nutrition and Food Research

**Manuscript ID**

mnfr.202300116

**Title**

Canola oil in association with resveratrol prevents non-alcoholic fatty liver disease in C56/BL mice

**Authors**

MANCA, CAMILA  
Ambrosio, Lívia Maria  
Ovídio, ppayao@usp.br;  
Osako, Mariana  
Matsuo, Flávia  
de Araújo, Paulo  
Bueno, Ana Carolina  
Jordao, Alceu

**Date Submitted**

27-Feb-2023

Molecular Nutrition and Food Research

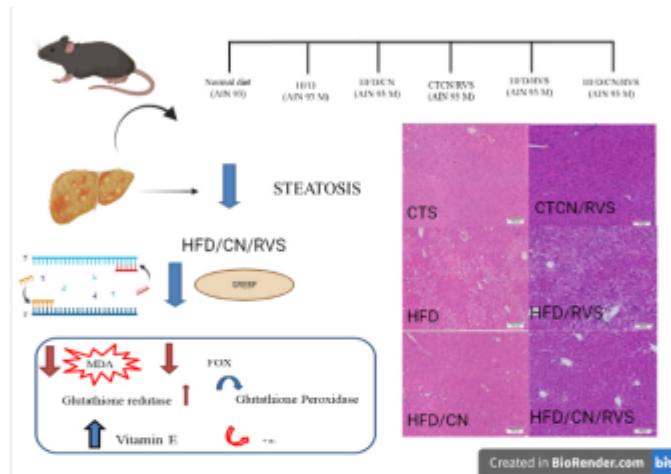


**Canola oil in association with resveratrol prevents non-alcoholic fatty liver disease in C56/BL mice**

Journal:	<i>Molecular Nutrition and Food Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>MANCA, CAMILA; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, medical clinic          Ambrosio, Livia Maria ; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, medical clinic          Ovidio, ppayao@usp.br; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, medical clinic          Osako, Mariana; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, . Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents          Matsuo, Flávia ; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents          de Araújo, Paulo ; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents          Bueno, Ana Carolina ; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Pediatric Endocrinology of Molecular Biology Lab. Nutrition and Metabolism          Jordao, Alceu; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Internal Medicine</p>
Keywords:	Non-alcoholic hepatic steatosis, canola oil, resveratrol,, fructose, polyunsaturated fatty acids

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51



254x177mm (72 x 72 DPI)





---

1 **Research article**

2 **Title:**

3 **Canola oil in association with resveratrol prevents non-alcoholic fatty liver disease in**  
4 **C56/BL mice**

5 Camila S. Manca<sup>1</sup>, Lívia Maria Cordeiro Simões-Ambrosio<sup>1</sup>, Paula P. Ovidio<sup>1</sup>, Mariana Kiomy  
6 Osako<sup>2</sup>, Flávia Sayuri Matsuo<sup>2</sup>, Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo<sup>2</sup>, Ana Carolina Bueno<sup>3</sup>  
7 and Alceu A. Jordão<sup>4</sup>.

8 1. Department of Internal Medicine, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo,  
9 Brazil.

10 2. Laboratory of Cell and Tissue Biology, Department of Cell and Molecular Biology and  
11 Pathogenic Bioagents, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto,  
12 Sao Paulo, Brazil.

13 3. Department of Pediatrics, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo Ribeirao  
14 Preto, Sao Paulo, Brazil.

15 4. Department of Health Sciences, Division of Nutrition and  
16 Metabolism Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirao Preto, Sao  
17 Paulo, Brazil.

18 **Contact information**

19 Professor Alceu Afonso Jordão, PhD

20 Ribeirao Preto Medical School - University of Sao Paulo

21 Avenida Bandeirantes, 3900 Monte Alegre, CEP14049-900

22 e-mail: [alceu@fmrp.usp.br](mailto:alceu@fmrp.usp.br)

23 +55 (16)3315-4564 / fax: +55(16)3633-1586. **Keywords:** Non-alcoholic hepatic steatosis,

24 canola oil, resveratrol, fructose, polyunsaturated fatty acids

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

25 **Abstract**

26 Objective: To evaluate the therapeutic potential of canola oil and resveratrol in the prevention  
27 of nonalcoholic fatty liver disease development. Methods: We evaluated in mice C57/BL body  
28 weight, gain weight. Liver steatosis and oxidative stress parameters were analyzed using  
29 parameters hepatics and histological methods. Results: The treatment with canola oil in  
30 association with resveratrol was more effective in preventing nonalcoholic fatty liver disease.  
31 Lipid droplet parameters, steatosis score, as well as genes involved in lipogenesis such as  
32 SREBPC1 and ChREB showed worse results in the group that received only resveratrol and  
33 better results in the association in canola oil and resveratrol. Conclusions: HDF/CN/RVS  
34 demonstrated better efficacy for the prevention of non-alcoholic liver disease while the use of  
35 isolated resveratrol did not demonstrate positive results and a valuable tool for management the  
36 NAFLD.

37

38

Food Peer Review

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 39 1. Introduction

40 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common manifestations of  
41 chronic liver disorders worldwide [1,2]. NAFLD is characterized by excessive accumulation of  
42 triglycerides in hepatocytes, which develops in the absence of other secondary causes [3]. The  
43 disease is reversible in early stages, but it can progress to non-alcoholic steatohepatitis (NASH),  
44 with development of inflammation and oxidative stress, leading to cirrhosis and hepatocellular  
45 carcinoma [4].

46 NAFLD has a multifactorial complex, and the fat accumulation in the liver can be due to *de*  
47 *novo* lipogenesis, including the up-regulation of upstream factors, such as the genes encoding  
48 the sterol regulatory element binding protein 1c (*Srebp-1c*) and the carbohydrate response  
49 element binding protein (*Chrebp*) [5]. These genes regulate enzymes involved in lipid  
50 biosynthesis, like the lipogenic transcription factors Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty  
51 acid synthetase (FAS) [2,5]. On the other hand, degradation of lipids is regulated by the  
52 peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), a controller of peroxisomal enzymes  
53 such as acylCoA oxidase (ACO) and mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase (ACD), which  
54 are both critical components of the fatty acid oxidation pathway [5].

55 Currently there is no specific guideline, nor FDA-approved pharmacotherapy for treatment  
56 of NAFLD [6]. The use of antioxidants and omega-3 has been studied for the prevention or the  
57 treatment of the disease. Canola oil is characterized by low levels (7%) of saturated fatty acids  
58 (SFAs), and substantial amounts of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and polyunsaturated  
59 fatty acids (PUFAs), including 61% oleic acid, 21% linoleic acid, and 11% alpha-linolenic acid  
60 (ALA) [7]. Moreover, there is compelling evidence of the beneficial effects of canola oil  
61 consumption [8].

62 Other antioxidant alternatives have also been studied [6]. Resveratrol (RSV; 3,5,4'-  
63 trihydroxystilbene) is a natural polyphenol, found in different plant foods, including grapes,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

64 berries and peanuts. RVS has being studied as a potential antioxidant with anti-inflammatory  
65 and antioxidants effects [9].

66 In the present study, we used a high fat/fructose-rich diet-induced NAFLD animal model to  
67 evaluate the therapeutic potential of canola oil and RSV isolated and or and set.

## 68 2. Materials and Methods

69 **2.1 Ethical considerations.** All procedures were conducted according to the Brazilian College  
70 of Animal Experimentation recommendations following the ARRIVE guidelines. This study  
71 was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Ribeirao Preto  
72 Medical School – University of Sao Paulo (FMRP-USP) (#129/2018).

73 **2.1.1 Animals.** Forty-eight male C57/B6J mice (4 week-old) were obtained from the FMRP-  
74 USP Central Animal House, and were housed under controlled temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and 12h  
75 light-dark cycle. The animals were randomly assigned to six experimental diet-groups (section  
76 2.1.2), all with water and food were supplied *ad libitum*. The mice's weight was 20 g at the  
77 beginning of the experiment. Body weight and food intake were assessed per cage (2  
78 animals/cage) over a period of 16 weeks, and are reported as mean food intake and weight in  
79 g/day. At the end of experiment, the animals were euthanized by decapitation. Liver,  
80 epididymal and retroperitoneal adipose tissues were excised, weighed and either frozen in liquid  
81 nitrogen or fixed in 4% formalin for further analysis.

82 **2.1.2 Experimental diets.** The control diet (CTS) was a standard AIN-93 diet for growth  
83 formulated with 7% soy bean oil as fat source [10]. The experimental diets were composed by  
84 a modified AIN-93 diet for growth in which lipid sources were substituted and elevated, and all  
85 carbohydrate sources were replaced by fructose. Two experimental diets were further enriched  
86 with 2 g/kg of the diet of RSV, which is equivalent to an average daily intake of 200 mg/day.  
87 Control canola oil/RSV (CTCN/RSV): standard AIN-93 diet for growth with the substitution  
88 of soy bean by canola oil, and the addition of RSV. High-fat and fructose (HFD): a western-

89 type diet containing 50% fat (lard) and 20% fructose. HFD/CN: 25% lard, 25% CN and 20%  
90 fructose. HFD/RVS: 50% lard, 20% fructose and RSV. HFD/CN/RVS: 25% lard, 25% CN and  
91 20% fructose, and RSV. The feed efficiency rate (FER), which expresses the efficiency of the  
92 diet in promoting weight gain, was calculated at the end of the experiment. Soy bean and canola  
93 vegetable oils (@Liza) were purchased at a local market. RSV was obtained in the form of  
94 TRANS-resveratrol (molecular formula: C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O, internal batch: PUR1006851, and with  
95 origin code: 440.500.000050.(Pragsolucoes). Vitamin, mineral mix, choline, and L-cystine  
96 were purchased from Rhoster (Araçoiaba da Serra, Brazil).

97 **2.1.3 Liver histological analysis.** Liver fragments were collected and immediately immersed  
98 in a flask containing 4% formalin (10% in buffered solution) (Sigma-Aldrich) for 16 hours. The  
99 samples were sectioned in into 5- $\mu$ m thick sections, mounted on glass slides, and stained with  
100 hematoxylin-eosin (H&E). Histological images were captured in a 20x objective using the  
101 Olympus BX61VS microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan. The ImageJ software was  
102 used to configure the images to binary mode (8-bit) and to adjust a visualization threshold, in  
103 which lipid droplets stand out, followed by quantification of the area corresponding to the fat  
104 droplet in percentage. Histological classification according to the non-alcoholic fatty liver score  
105 was performed according to Kleiner et al 2005 [11].

106 **2.1.4 Hepatic content analysis.** The liver concentrations of protein, triacylglycerols (TGs), and  
107 total cholesterol (TC) were evaluated using commercial kits (Labtest Diagnóstica S.A., Vista  
108 Alegre, Brazil). Total liver fat content was assessed using the adapted Bligh and Dyer method  
109 (1959) [12].

110 **2.1.5 Serum hormone and inflammatory markers evaluation.** The serum concentrations of  
111 resistin, leptin, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, PAI-1 and insulin were assessed by immunometry using  
112 the Luminex technology through Milliplex kits (Merck).

1  
2  
3  
4 113 **2.1.6 Hepatic lipid peroxidation, fox and antioxidant markers analysis.** Hepatic  
5  
6 114 malondialdehyde (MDA) was determined using the Gerard-Monnier et al. method [13] with  
7  
8 115 some modifications. Hepatic Fox was determined using the Galli F et al. method [13] with some  
9  
10 116 modifications [14]. Hepatic reduced glutathione (GSH) was determined using the Sedlak and  
11  
12 117 Lindsay method [15] with adaptations. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) was determined adapting the  
13  
14 118 Araud et al. method [16].

15  
16  
17  
18 119 **2.1.7 Relative gene expression analysis.** Total RNA from liver samples was extracted using  
19  
20 120 the TRIzol® Reagent and quantified by spectrometry (Nanodrop 2000; Thermo Fisher  
21  
22 121 Scientific Inc. Waltham, MA, USA) at 260 nm. RNA integrity was checked according to the  
23  
24 122 260/280 nm ratio with an acceptable range of 1.6–2.0 and confirmed by 1.2% agarose gel  
25  
26 123 electrophoresis. RNA samples (500 ng) were reverse transcribed using the High-Capacity  
27  
28 124 cDNA Reverse Transcription kit and MultiScribe® enzyme (Life Technologies). Real-time  
29  
30 125 qPCR was performed using the following TaqMan® assays (Applied Biosystems™  
31  
32 126 ThermoFisher Scientific): *Sirt1* (Mm01168521\_m1), *Pkaal1* (Mm01296696\_m1), *Srebp-*  
33  
34 127 *1a* (Mm00550338\_m1), *Mlxipl* (Mm02342723\_m1), *Nr1h3* (Mm00443451\_m1), *Ppara*  
35  
36 128 (Mm00440939\_m1) and *Actb* (Mm00607939\_s1) as an endogenous control, as previously  
37  
38 129 described. Relative gene expression levels were calculated using the using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method  
39  
40 130 [18].

## 41 131 **2.2 Statistical analysis**

42  
43 132 Parametric continuous data were presented as mean  $\pm$  standard deviation and their  
44  
45 133 means were compared by analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison  
46  
47 134 test. Non-parametric continuous data were presented as individual and median values, which  
48  
49 135 were compared using the Kruskal-Wallis's test with Dunn's multiple comparison test. The  
50  
51 136 statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. In all cases, the  
52  
53 137 significance level was prefixed to  $p < 0.05$ .

### 138 3. Results

#### 139 3.1 Effects of CN oil and RSV on body weight, weight gain, food intake, and energy intake 140 RSV daily intake (mg/kg/day).

141 Table 1 shows the data on the mice weigh and food intake according to the experimental  
142 diet groups. The body weight of HFD mice was higher ( $p<0.05$ ) than that of CTS throughout  
143 the 16 experimental weeks, and higher final body weight than all mice in the other experimental  
144 diet-groups. The animals fed with CN oil or RSV, as well as the combination of both,  
145 maintained gradual and homogeneous weight gain, which was similar to that of the CTS group  
146 (Fig1.A). The latter showed significant weight gain compared to the other groups, while the  
147 CTCN/RVS group showed lower weight over the experimental weeks. The HFD mice also  
148 showed greater weight gain ( $\Delta$ ) than the other experimental groups, whereas CTS and  
149 HFD/CN/RSV animals showed the lower weight gain (Fig1.B). Meantime, the food intake  
150 significantly varied between the groups ( $p<0.05$ ), being CTS and CTCN/RVS animals the ones  
151 with higher food intake, and HFD and associations the ones with lower food intake. The energy  
152 intake was similar among the groups. The feed efficiency rate (FER) was significantly increased  
153 in the mice fed with RSV, being higher in those in the HFD/RVS than in all other experimental  
154 groups. Amongst the animals receiving RSV, the antioxidant daily intake of those also fed with  
155 CN oil was significantly higher (CTCN/RVS and HFD/CN/RVS versus HFD/RVS).

#### 156 TABLE 1. Final body weight, body weight gain, food intake, energy intake and feed 157 efficiency rate

158 FIGURE 1 (A) Weight over the weeks

159 FIGURE 1 (B). Body weight gain on the 16 weeks.

160

161

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### 162 **3.2 Liver, epididymal and retroperitoneal adipose tissues weight and their relationship** 163 **with body weigh**

164 The hepatic tissue from the animals in the experimental groups had similar weight. The  
165 epididymal adipose tissue weight was higher in HFD mice when compared to those in CTS,  
166 CTCN/RVS, and HFD/CN/RVS groups ( $p < 0.05$ ). Likewise, the retroperitoneal adipose tissue  
167 weight was higher in the HFD mice when compared to those in all other groups ( $p < 0.0001$ ).  
168 The retroperitoneal adipose tissue from animals in the CTCN/RVS group was lower than that  
169 of those given HLF/CN, HLF/RVS and HLF/CN/RVS experimental diets. As expected, the sum  
170 of adipose tissues (epididymal and retroperitoneal) in the HFD group was higher than in the  
171 CTS, CTCN/RVS and HLF/CN/RVS groups, having the CTCN/RVS group the lowest value  
172 among the groups.

### 173 **Table 2. Phenotypic comparison of C57/BL mice fed the chow, HFD, CTS, HFD/CN,** 174 **CTCN/RVS, HFD/RVS and HFD/CN/RVS diet for 16 weeks.**

### 175 **3.3 Influence CN oil and RSV on serum hormonal and inflammatory markers**

176 The animals in the different experimental diet-groups had similar serum IL-6, TNF-  
177 alpha, PAI-1, leptin, and insulin levels. The addition of CN oil to the HFD supplemented with  
178 RSV diet resulted in decreased serum levels of MCP-1 (HFD/CN/RSV vs HFD/RSV,  $p < 0.001$ ,  
179 (Fig. 2).

### 180 **3.4 CN oil and RSV reduced the accumulation of hepatic fat**

181 The Fig. 3A displays representative images of the hepatic tissue sections subjected to  
182 histological analyses. The mice in the CTS group displayed normal liver histology. As expected,  
183 the HFD resulted in higher accumulation of total hepatic fat and lipid droplets when compared  
184 to CTS diet (both  $p < 0.01$ , Fig. 3B and C). Despite these findings, the partial substitution of  
185 lard by CN oil and the addition of RSV in HFD resulted in important decrease in total liver fat  
186 of HFD/CN/RSV-fed mice ( $p < 0.001$ ). Of note, this association was far more potent than either



1  
2  
3 187 CN oil, or RSV alone in preventing liver fat accumulation, leading to similar levels than  
4  
5 188 observed in the CTS group (Fig. 3B and C). However, the HFD mice exhibited increased liver  
6  
7 189 fat, classical steatosis such score steatosis (Fig. 3D).

## 190 2. INFLAMMATORY AND HORMONAL PARAMETERS

### 191 3.5. CN oil and RSV reduced the accumulation of hepatic triacylglycerol and total 192 cholesterol

193 The HFD animals had higher hepatic triacylglycerol and total cholesterol levels when  
194 compared to those in the CTS and HFD/CN/RVS groups. The addition of CN oil and RSV was  
195 able to significantly decrease the levels of these lipids into levels similar to those observed in  
196 CST mice ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4A and B). Interestingly, the partial substitution of lard by CN oil  
197 in HFD did not exert any effects in hepatic triacylglycerol and total cholesterol levels (HFD vs  
198 HFD/CN,  $p > 0.05$ ), but further addition of RSV significantly reduced triacylglycerol levels  
199 (HFD/CN vs HFD/CN/RVS,  $p < 0.001$ , Fig. 4A).

### 200 FIGURE 4. ANALYSIS OF TRIACYLGLYCEROL AND TOTAL CHOLESTEROL.

### 201 3.6. Effects of CN oil and RSV in the prevention of oxidative stress and in the improvement 202 of antioxidants parameters

203 The animals from the groups receiving RSV had significant lower levels of hepatic  
204 MDA than those who did not (CTS vs CTCN/RVS, HFD vs HFD/RVS, HFD/CN vs  
205 HFD/CN/RVS, all  $p < 0.001$ , Fig. 5A), suggesting that RSV exerts an inhibitory effect on lipid  
206 peroxidation. Moreover, despite being subjected to HFD, the animals in the HFD/CN/RVS diet  
207 group also had significant lower MDA levels than CTS diet ones, also suggesting the potential  
208 benefit of the association between CN oil and RSV over oxidative stress. FOX analyses further  
209 corroborate these findings, since FOX levels were significantly lower in HFD/CN/RVS than in  
210 CTS and HFD-fed animals (both  $p < 0.001$ , Fig. 5B).

1  
2  
3 211 **FIGURE 5. ANALYSIS OF OXIDATIVE STRESS BASED ON HEPATIC**  
4  
5 212 **PARAMETERS**  
6  
7 213 HFD/RVS mice had a lower level of GSH than those receiving CN oil (CTCN/RVS and  
8  
9 214 HLF/CN/RVS, both  $p < 0.001$ , Fig. 5C), which suggests a role for canola oil in the redox status  
10  
11 215 of the animals' liver tissue. The HFD/CN/RVS mice had higher hepatic vitamin levels those  
12  
13 216 receiving CTS or CTCN/RVS ( $p < 0.001$ , Fig. 5D).

### 17 217 **3.7. Influence of CN oil and RSV on the hepatic expression of genes involved in lipid** 18 19 218 **metabolism**

20  
21 219 The relative expression of *Sirt1* and *Prkaa-1* (AMPK coding gene) was similar in the  
22  
23 220 liver of animals submitted to the experimental diets. *Srebp1c* mRNA levels were decreased in  
24  
25 221 CTCN/RVS when compared to CTS and HFD/RVS diets (both  $p < 0.05$ ). *Nr1h3* expression  
26  
27 222 (LXR- $\alpha$  coding gene) was significantly lower in HLF/RVS-fed mice than in HLF/CN/RVS-fed  
28  
29 223 mice ( $p < 0.05$ ). The results are shown in Fig. 6.

### 33 224 **FIGURE 6. HEPATIC EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN LIPID** 34 35 225 **METABOLISM**

## 38 226 **4. Discussion**

39  
40  
41 227 Many lines of evidence regarding RSV have focused on its protective or beneficial  
42  
43 228 effects on NAFLD or NASH. Several studies have been performed in order to investigate the  
44  
45 229 therapeutic role of RSV against established NAFLD injury, however, there are limitations  
46  
47 230 regarding the time, the dosage and the models evaluated [2]. Hence, the present study is a  
48  
49 231 pioneer in the administration of CN oil in association with RSV in the prevention of NAFLD,  
50  
51 232 which challenges its comparison with other studies.

52  
53 233 The administration of RSV to HFD in association with CN oil demonstrated a preventive  
54  
55 234 effects in hepatic steatosis, as evidenced by the improvement of weight, hepatic histology,  
56  
57 235 oxidative status, inflammation and lipid contents. The groups subjected to HFD diet modulated

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

236 with CN and/or RSV (HFD/CN, HFD/RVS, and HFD/CN/RVS) showed lower weight gain  
237 than HFD alone, which demonstrates that HFD modulation was effective in the prevention of  
238 animal weight gain, which is in accordance with previous studies [18]. In line, the food  
239 consumption also varied among the experimental groups, but as expected, CTS and  
240 CTCN/RVS animals had higher consumption than those receiving HFD diets. Of note, there  
241 was no difference between the energy intake (kcal/day) of the studied groups, but the groups  
242 receiving RSV had higher feed efficiency rates.

243 The combination of CN oil and RSV showed an effective role in the prevention of  
244 hepatic fat accumulation. CTCN/RVS and HFD/CN/RVS diets may exert beneficial effects,  
245 and demonstrated greater effectiveness of the association CN oil and RSV, since HFD and  
246 HFD/RVS diets resulted in increased hepatic fat, lipid droplets, and steatosis score, and these  
247 data corroborate with the histological findings. In line, we observed increased mRNA levels of  
248 *Srebp1* in the liver of HFD/RVS-fed mice, which is a gene related to lipogenesis.

249 HFD and HFD/CN diets resulted in higher hepatic TGs levels when compared with  
250 HFD/CN/RVS, once again demonstrating a beneficial effect of RSV. This finding is further  
251 corroborated by the decreased levels of *Mboxpl* mRNA (Cherb coding gene), which is involved  
252 in *de novo* lipogenesis, in HFD/RVS than in HFD/CN-fed mice.

253 Manca et al 2023 [20] demonstrated a 16-week intervention with different commercial  
254 vegetable oils, and among them the same concentration of CN oil as in the present study, which  
255 demonstrated an improvement in the hepatic lipids accumulation.

256 Isolated, neither RVS nor CN oil, were effective in preventing liver steatosis in the  
257 present study, but their association was proved to be effective. The RSV metabolism has been  
258 widely studied in different models and experimental strategies, depending on the dosage, time  
259 of study and model used [6]. Once RVS enters the gastrointestinal tract, it undergoes extensive  
260 biotransformation, being supplied to various organs, modifying its bioavailability and activity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

[6]. It has low water solubility, short half-life, fast metabolism and low intestinal absorption rate, which limit its absorption and reduce its effectiveness. Studies have shown that a high-fat meal is able to inhibit the absorption of RSV. In the last decade, encapsulation of RVS has been studied as a method to improve its bioavailability, increase its solubility and propitiate its stabilization. The encapsulation is formed by a lipid membrane. Pharmacokinetic studies show which approach can be used to protect RVS from degradation and control its release [6,20].

However, RT-PCR revealed that there was a significant difference in gene expression between the studied groups, with greater gene expression of SREBP1C in CTS, that is, CT/RVS had a reduction and superregulation in HLF/RVS. SREBP1 is one of the most important transcription factors for regulating *de novo* lipogenesis in the liver, playing an important role in the pathogenesis of NAFLD [19].

Recent studies have shown that RSV decreases hepatic fat accumulation by activating SIRT1 and others have shown that RVS can attenuate fat deposition by inhibiting SREBP1C expression through the SIRT-FOX pathway. In addition, chemical activators of SIRT1 inhibit SREBP1C, correlating with a reduction in serum levels of cholesterol and hepatic lipids [20]. However, in our study, the HFD/RVS resulted in increased transcription factor expression *Srebp1c*, increasing *de novo* lipogenesis and consequent fat accumulation in the liver. This data was confirmed by total liver fat, % lipid droplet, and steatosis score.

The accumulation of hepatic fat can lead to the overproduction of free radicals that are not counteracted by the antioxidant defenses, leading to the oxidative stress observed in the progression of NAFLD. In the present study, the levels of MDA and FOX were lower in the treated groups, which demonstrates that the diet modulation resulted in a significant improvement in parameters related to oxidative stress. As a consequence, there was an increase in antioxidant parameters —GSH and vitamin E— being higher mainly in the HLF/CN/RVS

285 when compared to the CTCN/RVS group. Similar data corroborate positively with our study  
286 [20].

287 **5.0 Conclusions:** The use of CN oil in association with RSV seems to be an interesting  
288 alternative for the prevention of liver steatosis in the context of a western-style diet. It can be a  
289 low-cost and easy alternative to apply in patients with NAFLD.

290 **CRediT authorship contribution statement:** Camila Sanches Manca: Conceptualization,  
291 Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing, Writing – original draft. Paula Payao  
292 Ovidio More and Livia Simões: Methodology, Investigation, Formal analysis. Mariana, Flávia  
293 and Paulo: Methodology, Writing, Writing – original draft. Ana Carolina Bueno: formal  
294 analysis, supervision, writing – original draft, funding acquisition. Alceu Afonso Jordão:  
295 Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Resources, Writing, Writing – original draft,  
296 Funding acquisition.

297 **Declaration of competing interest**

298 The authors declare no conflicts of interest.

299 **Data availability**

300 Data will be made available on request.

301 **Acknowledgements** We thank Professor Mariana Kiomy Osako Laboratory of Cell and Tissue  
302 Biology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirao Preto  
303 Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. for the collaborate  
304 of the analyses histological. We thank collaboration Lab Endocrinology, Renata Sicchieri.

305 Figure 1. (A) Weight over the weeks. 1 (B). Body weight gain on the 16 weeks.

306 Figure 2. Inflammatory and Hormonal Parameters.

307 Figure 3. Analysis of Hepatic Parameters.

308 figure 4. Analysis of triacylglycerol and total cholesterol

309 Figure 5. Analysis of oxidative stress based on hepatic parameters.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 310 Figure 6. Hepatic expression of genes involved in lipid metabolism.
- 311 Table 1. Final body weight, body weight gain, food intake, energy intake and feed efficiency  
312 rate.
- 313 Table 2. Phenotypic comparison of C57/BL mice fed the chow, HFD, CTS, HFD/CN,  
314 CTCN/RVS, HFD/RVS and HFD/CN/RVS diet for 16 weeks.
- 315 [1] Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018. 1.11  
316 DOI:10.1038/nrgastro. 2017.109
- 317 [2] Chang CC, Chang CY, Lin PC, Huang JP, Chen KH, Yen TH, et al. *Chin J Physiol*.  
318 2020.4.149. DOI: 10.4103/CJP.CJP\_43\_20
- 319 [3] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. *Hepatology*. 2018;6. 1. 328. DOI:10.1002/hep.  
320 29367
- 321 [4] Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin. *Pharmacological*  
322 *Research* 2021.166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105517>.
- 323 [5] B.K. Cole, R.E. Feaver, B.R. Wambhoff, A. Dash. 2017. 13. 193. DOI:  
324 <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1410135>
- 325 [6] Valenzuela-Vallejo L, Guatibonza-García V, Mantzoros CS. 2022.1.;136.155248. DOI:  
326 10.1016/j.metabol.2022.155248.
- 327 [7] Behnaz Pourrajaba, Elham Sharifi-Zahabia, Sepideh Soltanib, Hossein Shahinfara and  
328 Farzad Shidfara. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022.1. DOI:  
329 10.1080/10408398.2022.2100314
- 330 [8] Amiri, M., H. Raeisi-Dehkordi, N. Sarrafzadegan, S. C. Forbes, and A. Salehi-Abargouei.  
331 2020. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* v. 30. 2133. DOI:  
332 10.1016/j.numecd.2020.06.007.

- 333 [9] Silvia, T.X.O, Catalina M.M, Margalida M.M, M Magdalena Quetglas-Llabrés Antoni  
334 Pons, Josep A Tr, Antoni, S. *Curr Pharm Des.* 2021;27(22):2558-2570. DOI:  
335 10.2174/1381612826666200417165801.
- 336 [10] Reeves PG; Nielsin FH; Fahey GC, JR. *J Nutr.* 1993 nov. 123.1939. DOI:  
337 10.1093/jn/123.11.1939.
- 338 [11] David E Kleiner et al. *Hepatology.*2005.41.1313.DOI: 10.1002/hep.20701.
- 339 [12] E. G. Bligh and W. J. Dyer. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.* 1959. 37,  
340 911. DOI: 1959.10.1139/c59-099
- 341 [13] Gerard-Monnier D; Erdelmeiver I; Regnard K; Mozehenry N; Yadan JC; Chaudierel J.  
342 *Pharm Methods.* 2012.3.94.DOI: 10.4103/2229-4708.103883
- 343 [14] Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. *Contrib Nephrol.*  
344 2005;149:240. PubMed PMID: 15876848. Epub 2005/05/07. eng.
- 345 [15] Sedlack J, RH. L. *Anal Biochem.* 1968;25:192. PMID: 4973948.
- 346 [16] Amaud J; Fortis I; Blachier S; Kia D; Favier PMID: 1818046. *J Chromatogr.*1991. 572.  
347 103.DOI: 10.1016/0378-4347(91)80476-s.
- 348 [17] Xiuqin Fan, Hongyang Yao<sup>1</sup>, Xuanyi Liu, Qiaoyu Shi, Liang Lv, Ping Li, Rui Wang,  
349 Tiantian Tang and Kemin Qi. *Frontiers in Nutrition.* 2020.7. 589771
- 350 [18] LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. *Methods.* 2001. 25, p. 402.2001.
- 351 [19] Silvia Tejada, Xavier Capó, Catalina M Mascaró, Margalida Monserrat-Mesquida, M  
352 Magdalena Quetglas-Llabrés, Antoni Pons, Josep A. Tur and Antoni Sureda. *Current*  
353 *Pharmaceutical Design.* 2021. 27. 2558. DOI: 10.2174/1381612826666200417165801
- 354 [20] C.S. Manca, L. M. C.Simões-Ambrosio, P.P.Ovidio , L.Z. Ramalho and A.A. Jordao.  
355 *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2023. DOI:  
356 <https://doi.org/10.1155/2023/4197955>
- 357

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

358 FIGURE 1 (A) Weight over the weeks

359

360

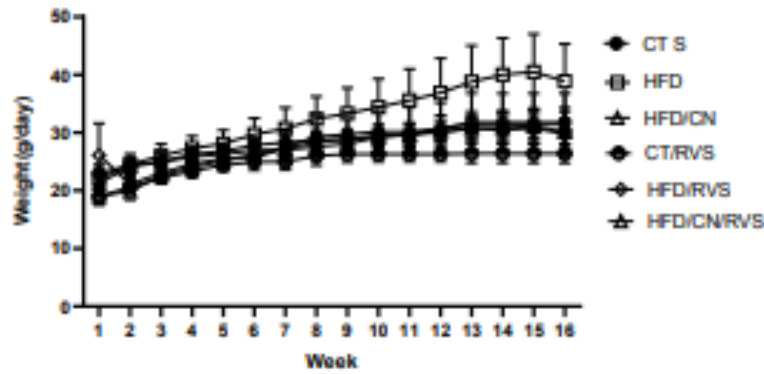
361

362

363

364

365



366 FIGURE 1 (B). Body weight gain on the 16 weeks.

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

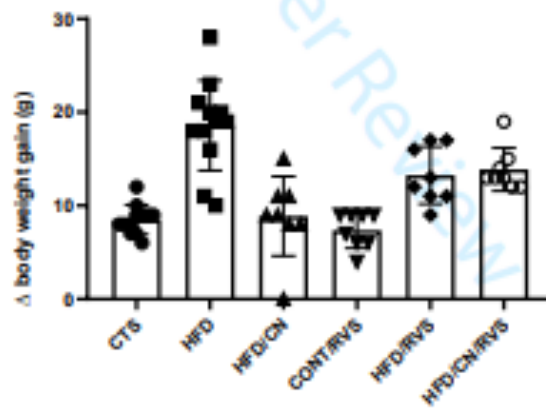
386

387

388

389

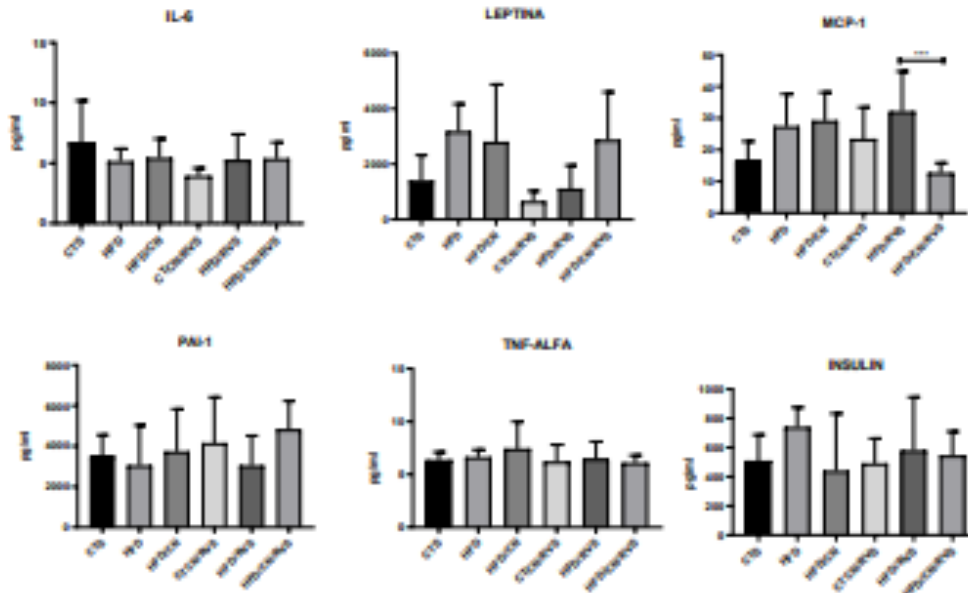
390





391

392 FIGURE 2. INFLAMMATORY AND HORMONAL PARAMETERS.



393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

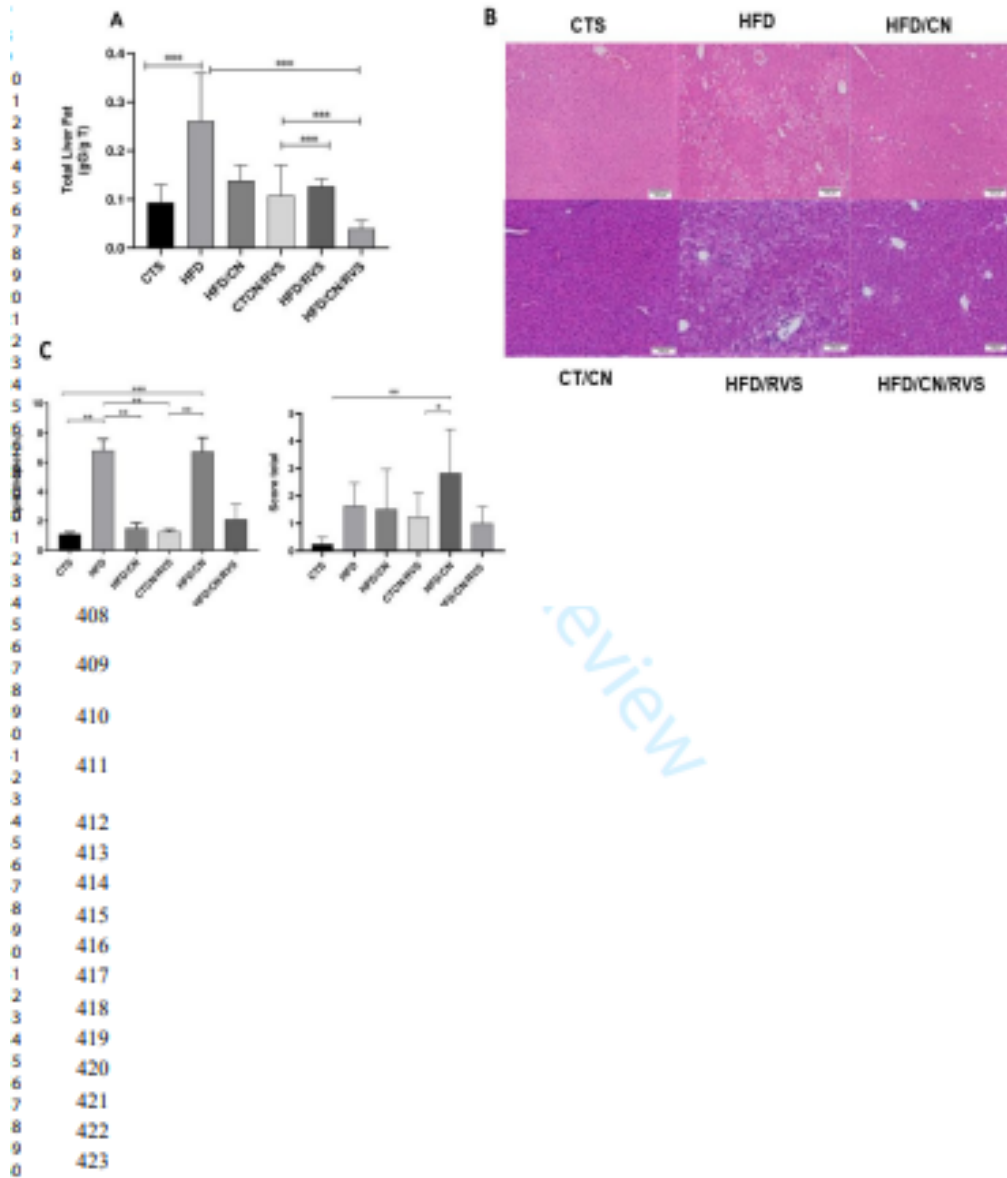
422

423

424

425

407 FIGURE 3. ANALYSIS OF HEPATIC PARAMETERS.



424 FIGURE 4. Analysis of triacylglycerol and total cholesterol

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

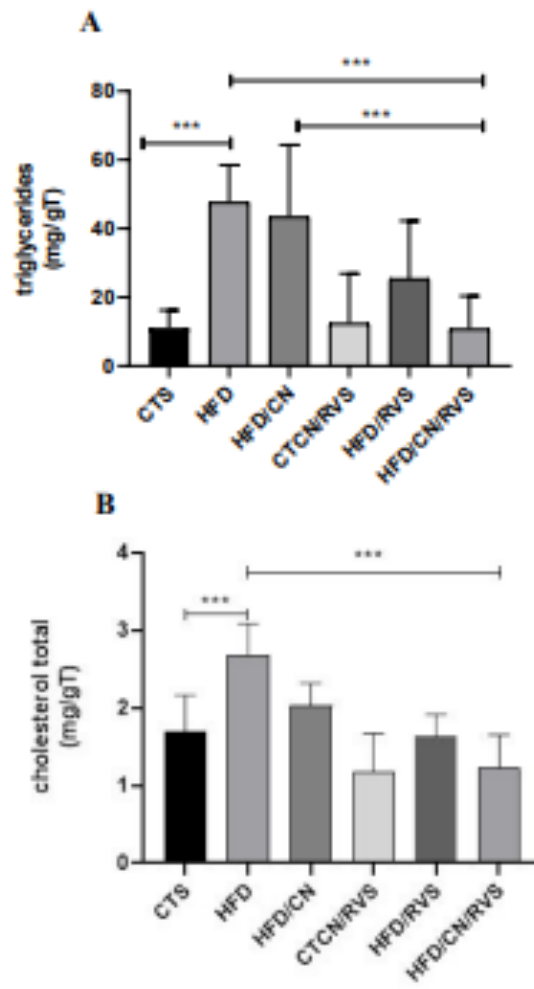
446

447

448

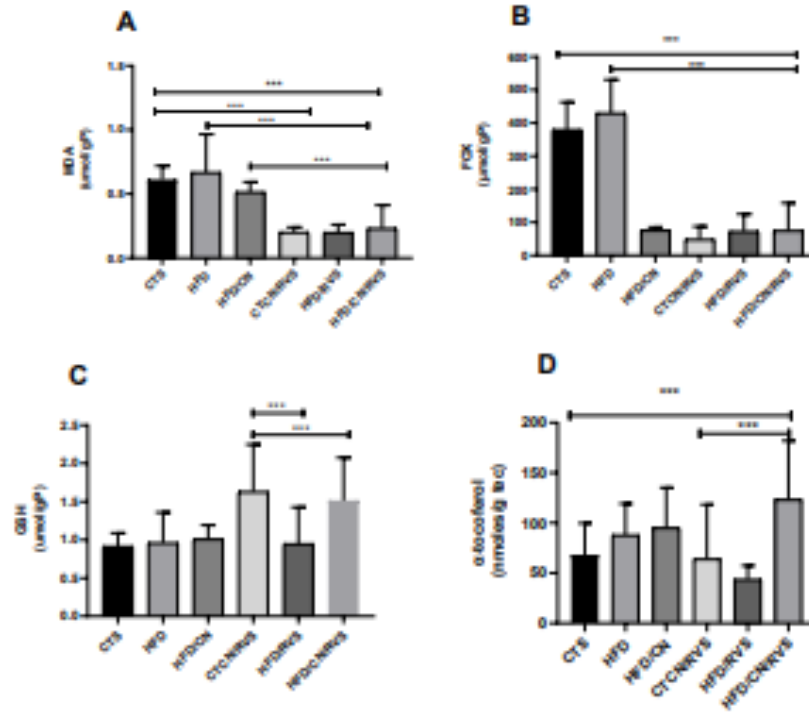
449

450



450 FIGURE 5. ANALYSIS OF OXIDATIVE STRESS BASED ON HEPATIC PARAMETERS

451



475

476

477

478

479

480

481

482

483

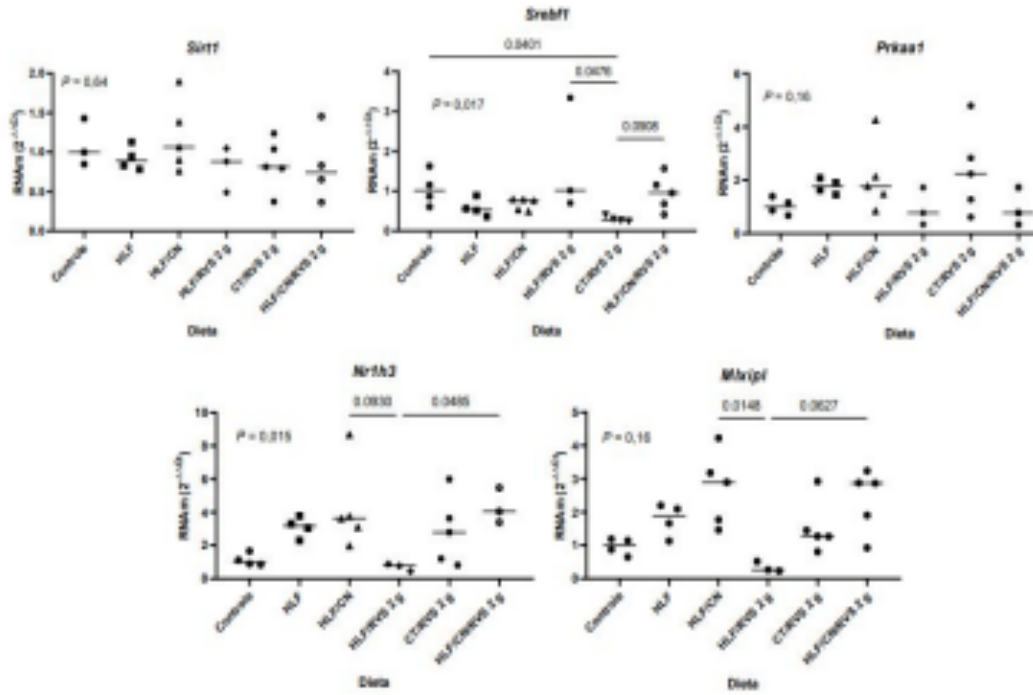
484

485

486

487 FIGURE 6. HEPATIC EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN LIPID METABOLISM

488



489

490

491

492

493

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

**TABLE 2. Phenotypic comparison of C57/BL mice fed the chow, HFD, CTS, HFD/CN, CTCN/RVS, HFD/RVS and HFD/CN/RVS diet for 16 weeks.**

	CTS	HLF	HLF/CN	CT/RVS	HLF/RVS	HLF/CN/RVS
Liver weight (g)	0,88±0,31	1,16±0,31	0,98±0,08	1,13±0,13	1,15±0,13	1,13±0,13
Liver weight (%BW)	2,90±0,99	2,90±0,49	3,17±0,56	4,30±0,27*	3,70±0,58	3,0±0,35
Epididymal adipose tissue (g)	0,58±0,08 <sup>a</sup>	2,16±0,53	1,24±0,32	0,58±0,08 <sup>a</sup>	1,33±0,73	0,95±0,65 <sup>a</sup>
Epididymal adipose tissue (%BW)	2,08±0,28 <sup>a</sup>	6,16±2,58	3,81±0,98	2,08±0,28	4,33±2,10	3,16±1,89 <sup>a</sup>
Retroperitoneal adipose tissue (g)	0,27±0,10	0,80±0,17*	0,51±0,18 <sup>a</sup>	0,08±0,05 <sup>a</sup>	0,49±0,30 <sup>***</sup>	0,37±0,28 <sup>***</sup>
Retroperitoneal (% BW)	0,91±0,28	2,25±0,75*	1,45±0,52	0,25±0,45 <sup>ns</sup>	1,58±0,99 <sup>**</sup>	1,08±0,99 <sup>a</sup>
Adipose tissue sum (g)	0,85±0,88	3,01±0,70*	1,75±0,60 <sup>**</sup>	0,67±0,09 <sup>a</sup>	1,93±1,06 <sup>**</sup>	1,33±0,91 <sup>a</sup>
Adipose tissue sum (%BW)	2,83±0,81	7,59±1,23*	5,68±1,75	2,5±0,30 <sup>a</sup>	6,10±3,44 <sup>***</sup>	4,32±2,95 <sup>a</sup>