

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NUTRIÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA

**Impacto do consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica no
metabolismo lipídico, inflamação e desenvolvimento de esteatose
hepática**

Júlia Galbiati de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila Raquel
Teixeira Damasceno

São Paulo

2023

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

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

de Souza, Júlia Galbiati
Impacto do consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica no metabolismo lipídico, inflamação e desenvolvimento de esteatose hepática / Júlia Galbiati de Souza; orientadora Nágila Raquel Teixeira Damasceno. -- São Paulo, 2023.
108 p.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Esteatose hepática . 2. Dieta rica em frutose. 3. Dieta hiperlipídica. I. Damasceno, Nágila Raquel Teixeira, orient. II. Título.

JÚLIA GALBIATI DE SOUZA

Impacto do consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica no metabolismo lipídico, inflamação e desenvolvimento de esteatose hepática

Versão revisada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2023

SOUZA, JG. Consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica modulam negativamente a inflamação e o metabolismo lipídico ao nível hepático [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno
Instituição: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP)
Julgamento: _____

Prof. Dr. Henrique Andrade Rodrigues da Fonseca
Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein
Julgamento: _____

Profa. Dra. Inar de Castro
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP)
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha família, por ser minha
fonte de inspiração e por ser meu
alicerce desde sempre.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à Deus por todas as oportunidades que me concedeu até aqui, com certeza, sem as graças dEle nada seria possível.

Agradeço a minha família, por sempre me apoiarem ao longo de toda a trajetória da vida, por todos os ensinamentos e por acreditarem que tudo é possível. À minha mãe Clélia agradeço por ser impulsionadora de todos os meus sonhos e com seu jeito único de ser me mostrar que sempre sou capaz de alcançar os meus objetivos. Ao meu pai Celso sou grata por me ensinar que sempre em momentos de dificuldade há sempre alternativas para continuarmos a trajetória e alcançar meus objetivos, além de me ensinar sobre o amor, o perdão e a gratidão. Ao meu querido irmão Celso Júnior, o meu eterno Juninho, agradeço por ser meu parceiro de vida desde pequeno e por ser minha dupla de trajetória acadêmica mesmo estando longe fisicamente, obrigada por todas as conversas sobre os desafios da pós-graduação e por compartilhar tantas coisas comigo.

Ao meu namorado Pedro, meu melhor amigo e confidente, agradeço por nunca soltar a minha mão e por ser meu alicerce nesses anos de pós-graduação, sem seu apoio e carinho não sei como teria sido esses 2 anos. Obrigada por sempre me impulsionar e por ser um grande admirador do meu estudo. Além disso, não poderia deixar de agradecer aos meus sogros, Alceu e Sônia, por sempre me escutarem e me apoiarem na vida acadêmica, obrigada por cada partilha.

Agradeço imensamente a minha orientadora Professora Dra. Nágila Damasceno por ter aberto as portas da pós-graduação para mim, por me impulsionar a ser cada dia melhor dentro da universidade desde o primeiro dia de convívio. Com certeza aprendi e aprendo muito com ela. Obrigada por acreditar em meu potencial e por sempre abrir as portas para um futuro melhor para todos seus alunos.

Ao meu grupo de pesquisa CETO USP, me faltam palavras para descrever essa equipe de milhões. Agradeço ao Glaucivan, por ser meu companheiro desde o começo dessa jornada, a qual vivenciamos tantas dificuldades juntos, mas que sempre acreditamos que seria possível e que tudo valeria a pena no final. À Ribanna, minha dupla dentro da universidade e fora dela também, obrigada por todas as conversas, dias de luta no laboratório e por sempre nos ajudarmos nas dificuldades, mas também nas

conquistas e comemorarmos juntas cada uma destas. À minha aluna de iniciação científica Fernanda por ser sempre pró ativa e ajudar tanto o grupo sempre que foi solicitada, obrigada por tudo e com certeza você terá um futuro brilhante. À nossa técnica Rosana, que com todo seu carisma, sem igual, e com muito café, sempre me ajudou a cada dia dentro do laboratório e com quem eu aprendi tanto ao longo desses anos. Não poderia deixar de agradecer as demais alunas que fizeram parte do grupo CETO USP, Maria Eduarda e Andréa, obrigada por toda ajuda e apoio.

Agradeço aos demais alunos da pós-graduação e colegas de laboratório os quais sempre partilhamos nossas vivências e dificuldades, mas que nos apoiamos para juntos construirmos uma trajetória de grande conhecimento.

Aos meus amigos de vida, obrigada por me apoiarem e estarem ao meu lado ao longo dessa jornada, alguns por perto e outros mesmo longe. Gratidão pela amizade e companheirismo.

Agradeço a Pós-graduação da Faculdade de Saúde Pública por me proporcionar tantas experiências dentro dessa universidade incrível, a qual tenho orgulho de fazer parte e por estar realizando o sonho de cursar minha pós na melhor universidade do país, a Universidade de São Paulo, USP.

E agradeço, imensamente, a CAPES (nº do processo 88887.609440/2021-00) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

EPÍGRAFE

“O importante é não parar de questionar” (Albert Einstein).

RESUMO

Impacto do consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica no metabolismo lipídico, inflamação e desenvolvimento de esteatose hepática.

Introdução: A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracteriza-se pelo acúmulo de triglicerídeos (TG) nos hepatócitos, destacando-se a elevada prevalência de esteatose hepática (NAFL). A NAFL é uma condição clínica definida pelo acúmulo de ácidos graxos (AG) no fígado, obtidos pela ingestão direta de gorduras e carboidratos e/ou pela síntese de AG via ativação da lipogênese. A NAFL é desencadeada por um conjunto de fatores, como o padrão dietético, o estilo de vida e a genética. Dietas hipercalóricas, caracterizadas pela presença de gorduras saturadas e carboidratos simples exercem importante papel no desenvolvimento da NAFL. Além disso, uma dieta rica em carboidratos simples, destacando-se a frutose, também é importante no NAFL, visto que a frutose, ao ser ingerida, é, majoritariamente, metabolizada pelo fígado, sendo assim, um componente mais sensível à lipogênese. **Objetivo:** Avaliar o impacto do consumo excessivo de frutose e lipídeos na modulação da inflamação e no metabolismo lipídico hepático. **Metodologia:** O estudo foi baseado em modelo experimental com 100 dias de seguimento. Dezoito ratos da espécie *Wistar*, machos e adultos jovens (7 semanas) foram distribuídos em 3 grupos: Dieta Controle (DC) (n=6) – ração comercial e água filtrada; Dieta Frutose (DF) (n=6) – ração comercial e água filtrada com 30% de frutose; e Dieta Hiperlipídica (DH) (n=6) – ração hiperlipídica e água filtrada. Ração e água foram administradas *ad libitum*. Após a eutanásia, o sangue e o fígado foram coletados. **Resultados:** Os animais do grupo DH tiveram um consumo de ração menor, assim como os animais do grupo DF, porém esses apresentaram um consumo calórico maior comparado ao grupo DC. Por outro lado, o aumento do comprimento foi significativo para todos, tendo o grupo DH apresentado maior crescimento. Conforme esperado, a cetose plasmática foi maior no grupo DH, assim como as enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Glicose e frutose plasmáticas foram similares entre os grupos. O peso relativo do fígado foi maior no grupo DF comparado ao grupo DH. O conteúdo de colesterol total (CT), TG e ácidos graxos não esterificados (AGNE) foi superior no grupo que recebeu DH. Inesperadamente, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram superiores no grupo DC. Em relação a fosfolipase 3 associada à patatina (PNPLA3) observamos aumento expressivo no grupo DF comparado aos animais alimentados com DH, porém, os grupos foram semelhantes em relação ao fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e ao membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6 (TM6SF2). As citocinas - interleucinas I-beta (IL-1 β), 6 (IL-6), 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF- α) foram maiores no grupo DF. Na análise da histologia do tecido hepático observou-se a presença de infiltrado inflamatório acentuado e de esteatose hepática no grupo DH. **Conclusão:** Frutose (30%) e lipídios (90%), quando consumidos de forma crônica (100 dias) promovem inflamação e acúmulo de lipídios hepático compatíveis com a DHGNA.

Palavras chave: Esteatose hepática, dieta rica em frutose, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

Impact of excessive fructose consumption and high-fat diet on lipid metabolism, inflammation and development of hepatic steatosis

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by the triglycerides (TG) accumulation in hepatocytes, highlighting the high prevalence of hepatic steatosis (NAFL). NAFL is a clinical condition defined by liver fatty acids (FA) accumulation, obtained by direct ingestion of fats and carbohydrates and/or by FA synthesis via lipogenesis activation. NAFL is triggered by a number of factors, such as dietary pattern, lifestyle and genetics. Hypercaloric diets, characterized by the presence of saturated fats and simple carbohydrates, play an important role in the development of NAFL. In addition, a diet rich in simple carbohydrates, especially fructose, is also important in NAFL, since fructose, when ingested, is mostly metabolized by liver, thus being a component that is more sensitive to lipogenesis. **Objective:** To evaluate the impact of excessive consumption of fructose and lipids on the inflammation modulation and hepatic lipid metabolism. **Methodology:** The study was based on a 100 days follow-up experimental model. Eighteen Wistar rats, male and young adults (7 weeks old) were distributed into 3 groups: Control Diet (CD) (n=6) – commercial chow and filtered water; Fructose Diet (FD) (n=6) – commercial feed and filtered water with 30% fructose; and High-fat Diet (HFD) (n=6) – high-fat diet and filtered water. Chow and water were administered *ad libitum*. After euthanasia, blood and liver were collected. **Results:** HFD animals group had a lower feed intake, as well as the FD animals group, but these ones had a higher caloric intake compared to the CD group. On the other hand, the length increase was significant for all and the HFD group showed greater growth. As expected, plasma ketosis was higher in the DH group, as were liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP). Plasma glucose and fructose were similar between groups. Liver relative weight was higher in the DF group compared to the HFD group. Total cholesterol (TC), TG and non-esterified fatty acids (NEFA) content was higher in HFD group. Unexpectedly, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were higher in CD group. Regarding patatin-associated phospholipase 3 (PNPLA3), we observed a significant increase in FD group compared to animals fed with HD, however, the groups were similar in relation to fibroblast growth factor 21 (FGF21) and member 2 of the protein superfamily transmembrane 6 (TM6SF2). Cytokines - interleukins I-beta (IL-1 β), 6 (IL-6), 10 (IL-10) and tumor necrosis factor (TNF- α) were higher in FD group. In the analysis of the hepatic tissue histology, the presence of accentuated inflammatory infiltrate and hepatic steatosis was observed in DH group. **Conclusion:** Fructose (30%) and lipids (90%), when consumed chronically (100 days) promote inflammation and hepatic lipids accumulation compatible with NAFLD.

Keywords: Fatty Liver, High Fructose diet, High-Fat diet.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fígado com presença de esteatose hepática..... | 19 |
| Figura 2. Patogênese da NAFL..... | 21 |
| Figura 3. Desenvolvimento e progressão da DHGNA..... | 23 |
| Figura 4. Metabolismo da frutose ao nível hepático..... | 28 |
| Figura 5. Fluxograma do estudo..... | 30 |
| Figura 6. Descrição da oferta das dietas e da água, segundo grupos de intervenção.. | 31 |
| Figura 7. Escala temporal de monitoramento ao longo do experimento..... | 34 |
| Figura 8. Procedimentos realizados após a eutanásia para obtenção do fígado..... | 37 |
| Figura 9. Avaliação de consumo de ração e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção..... | 49 |
| Figura 10. Variação do consumo de ração entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... | 50 |
| Figura 11. Calorias consumidas pelas rações e CEA/calorias entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção..... | 51 |
| Figura 12. Avaliação de consumo de água e sua variação entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após de 100 dias de intervenção..... | 52 |
| Figura 13. Avaliação de consumo de frutose, em gramas, entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção..... | 53 |
| Figura 14. Avaliação de ingestão de calorias totais (ração + água, contendo frutose diluída) e do CEA/calorias, entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Variação de calorias consumidas entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... | 54 |
| Figura 16. Avaliação de peso e de comprimento entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... | 55 |
| Figura 17. Variação de peso e comprimento entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... | 55 |
| Figura 18. Concentração de glicose e cetose plasmática entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias e intervenção.. | 56 |
| Figura 19. Peso bruto e relativo dos órgãos entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 57 |
| Figura 20. Concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), monoinsaturados (MUFA) e saturados (AGS) no tecido hepático entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 64 |
| Figura 21. Concentração ácidos graxos no tecido hepático das séries ômega 3 e ômega 6 entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 65 |
| Figura 22. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatória no tecido hepático entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 67 |
| Figura 23. Concentração de fosfolipase 3 associada à patatina (PNPLA3), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6 (TM6SF2) no tecido hepático entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 68 |
| Figura 24. Fotomicrografia do tecido hepático destacando a infiltração de polimorfonucleares inflamatórios e gordura entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Descrição da composição nutricional da ração Nuvilab CR-1..... 32
- Tabela 2.** Descrição da composição nutricional teórica das dietas hiperlipídicas produzidas e administradas aos animais, conforme proporções 1:1, 2:1 e 4:1..... 48
- Tabela 3.** Perfil bioquímico plasmático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... 57
- Tabela 4.** Perfil bioquímico do tecido hepático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... 58
- Tabela 5.** Incorporação de ácidos graxos no tecido hepático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção após 100 dias de intervenção..... 61
- Tabela 6.** Análise histológica para avaliação de infiltração inflamatória, necrose e gordura no tecido hepático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ACC-1 | acetil-CoA carboxilase |
| ACLY | citrato liase |
| ADP | difosfato de adenosina |
| AG | ácido graxo |
| AGNE | ácido graxo não esterificado |
| AGS | ácido graxo saturado |
| ALT | alanina aminotransferase |
| AMP | monofosfato de adenosina |
| APO B | apolipoproteína B |
| AST | aspartato aminotransferase |
| ATP | trifosfato de adenosina |
| BCA | ácido bicinconínico |
| BHA | tert-butil-hidroquinona |
| CEA | coeficiente de eficácia alimentar |
| CG | cromatografia gasosa |
| CHC | carcinoma hepatocelular |
| ChREBP | proteína de ligação de elemento responsiva a carboidrato |
| CO2 | gás carbônico |
| CPT | carnitina palmitoil transferase |
| CT | colesterol total |
| DC | dieta controle |
| DCNT | doença crônica não transmissível |

| | |
|---------|--|
| DCV | doença cardiovascular |
| DF | dieta frutose |
| DH | dieta hiperlipídica |
| DHA | ácido docosahexaenóico |
| DHGNA | doença hepática gordurosa não alcoólica |
| DLP | dislipidemias |
| DM2 | diabetes mellitus tipo 2 |
| DNL | lipogênese de novo |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetraacético |
| EP | espaço porta |
| EM | <i>Expectation-maximization</i> |
| FA | fosfatase alcalina |
| FGF21 | fator de crescimento de fibroblasto 21 |
| FMUSP | Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo |
| FOS | frutooligossacarídeos |
| FSP-USP | Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo |
| GLUT 2 | transportador de glicose 2 |
| GLUT 8 | transportador de glicose 8 |
| GGT | gama glutamil transferase |
| GWAS | estudo de associação genômica |
| HCC | carcinoma hepatocelular |
| HCLF | <i>high-carb low fat</i> |
| HDL | lipoproteína de alta densidade |
| I148M | substituição da metionina pela isoleucina no gene 148 |

| | |
|--------------|---|
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IL-1 β | interleucina 1 beta |
| IL-6 | interleucina 6 |
| IL-10 | interleucina 10 |
| IMC | índice de massa corporal |
| IMP | monofosfato de inosina |
| IMT | Instituto de Medicina Tropical |
| KHK-C | cetoexquinase C |
| LDL | lipoproteína de baixa densidade |
| LPS | lipopolissacarídeos |
| MAFLD | doença hepática gordurosa associada ao metabolismo |
| MEC | matriz extracelular |
| MUFA | ácido graxo monoinsaturado |
| NAFL | esteatose hepática não alcoólica |
| NASH | esteatohepatite não alcoólica |
| PNPLA3 | fosfolipase 3 associada à patatina |
| PPAR | receptor ativado por proliferador de peroxissoma |
| PUFA | ácido graxo poli-insaturado |
| RI | resistência à insulina |
| ROS | espécies reativas de oxigênio |
| SM | síndrome metabólica |
| SPSS | <i>Statistic package for the social science</i> |
| SREBP-1c | proteína de ligação do elemento regulador de esterol 1c |
| TA | tecido adiposo |

| | |
|---------------|--|
| TACO | Tabela Brasileira de Composição de Alimentos |
| TBARS | substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TBCA | Tabela Brasileira de Composição de Alimentos |
| TG | triglicerídeos |
| TM6SF2 | membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6 |
| TNF- α | fator de necrose tumoral |
| USDA | <i>United States Department of Agriculture</i> |
| VET | valor energético total |
| VLDL | lipoproteína de muito baixa densidade |
| XO | xantina oxidase |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 | <i>ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA ESTEATOSE HEPÁTICA</i> | 19 |
| 1.2 | <i>FISIOPATOLOGIA DA ESTEATOSE HEPÁTICA</i> | 20 |
| 1.3 | <i>ASPECTOS NUTRICIONAIS</i> | 24 |
| 1.3.1 | <u>DIETAS HIPERLIPÍDICAS</u> | 25 |
| 1.3.2 | <u>DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES</u> | 26 |
| 1.3.3 | <u>DIETA RICA EM FRUTOSE</u> | 27 |
| 2. | OBJETIVO | 29 |
| 3. | METODOLOGIA | 30 |
| 3.1 | <i>DELINEAMENTO DO ESTUDO</i> | 30 |
| 3.2 | <i>TAMANHO AMOSTRAL E DESENHO EXPERIMENTAL</i> | 30 |
| 3.3 | <i>ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS</i> | 31 |
| 3.4 | <i>FORMULAÇÃO DAS DIETAS</i> | 31 |
| 3.5 | <i>MONITORAMENTO DOS ANIMAIS</i> | 34 |
| 3.5.1 | <u>PESO CORPORAL</u> | 35 |
| 3.5.2 | <u>COMPRIMENTO NASOCAUDAL</u> | 35 |
| 3.5.3 | <u>AVALIAÇÃO DO CONSUMO DAS RAÇÕES E ÁGUA</u> | 35 |
| 3.5.4 | <u>AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA NUTRICIONAL</u> | 35 |
| 3.5.5 | <u>AVALIAÇÃO DA CETOSE E GLICOSE NO SANGUE</u> | 36 |
| 3.5.6 | <u>EUTANÁSIA DOS ANIMAIS</u> | 36 |
| 3.6 | <i>COLETA DE AMOSTRAS BIOQUÍMICAS</i> | 36 |
| 3.6.1 | <u>SANGUE</u> | 36 |
| 3.6.2 | <u>FÍGADO</u> | 37 |
| 3.7 | <i>ANÁLISES BIOQUÍMICAS NO PLASMA</i> | 37 |
| 3.7.1 | <u>DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE</u> | 37 |
| 3.7.2 | <u>ENZIMAS HEPÁTICAS</u> | 38 |
| 3.8 | <i>ANÁLISES NO TECIDO HEPÁTICO</i> | 38 |
| 3.8.1 | <u>EXTRATO AQUOSO HEPÁTICO</u> | 38 |
| 3.8.2 | <u>PROTEÍNAS TOTAIS</u> | 39 |
| 3.8.3 | <u>PERFIL LIPÍDICO</u> | 39 |
| 3.8.4 | <u>SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)</u> ... 40 | |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 3.8.5 | <u>DETECÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS</u> | 40 |
| 3.8.6 | <u>FOSFOLIPASE 3 ASSOCIADA À PATATINA (PNPLA3)</u> | 41 |
| 3.8.7 | <u>MEMBRO 2 DA SUPERFAMÍLIA DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA 6 (TM6SF2)</u> | 42 |
| 3.8.8 | <u>FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 21 (FGF21)</u> | 42 |
| 3.9 | <i>ANÁLISE EXTRATO LIPÍDICO HEPÁTICO</i> | 43 |
| 3.9.1 | <u>EXTRATO LIPÍDICO HEPÁTICO</u> | 43 |
| 3.9.2 | <u>PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NOS HEPATÓCITOS</u> | 44 |
| 3.10 | <i>HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO</i> | 45 |
| 3.11 | <i>COMITÊ DE ÉTICA</i> | 46 |
| 3.12 | <i>ASPECTOS FINANCEIROS</i> | 46 |
| 4. | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |
| 5. | RESULTADOS | 48 |
| 5.1 | <i>COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS DIETAS HIPERLIPÍDICAS</i> | 48 |
| 5.2 | <i>PERFIL DE CONSUMO ALIMENTAR E ANTROPOMÉTRICO</i> | 49 |
| 5.3 | <i>AVALIAÇÃO CETOSE E GLICOSE PLASMÁTICA</i> | 55 |
| 5.4 | <i>PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO</i> | 56 |
| 5.5 | <i>AVALIAÇÃO DO TECIDO HEPÁTICO</i> | 57 |
| 5.6 | <i>PERFIL BIOQUÍMICO DO TECIDO HEPÁTICO</i> | 57 |
| 5.7 | <i>INCORPORAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO HEPÁTICO</i> | 59 |
| 5.8 | <i>CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS</i> | 67 |
| 5.9 | <i>ANÁLISES DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À ESTEATOSE HEPÁTICA</i> | 67 |
| 5.10 | <i>HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO</i> | 68 |
| 6. | DISCUSSÃO | 71 |
| 7. | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| | APÊNCICES | 94 |
| | ANEXOS | 106 |
| | CURRÍCULO LATTES | 108 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA ESTEATOSE HEPÁTICA

A esteatose é uma doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) caracterizada pelo acúmulo de triglicerídeos (TG) nas células do fígado, ou seja, nos hepatócitos. Essa condição é resultante do desbalanço entre a síntese lipídica, ocasionada a partir da absorção de ácidos graxos (AG) e pela lipogênese de novo (DNL) e a sua eliminação, isto é, a oxidação de AG mitocondriais e a incorporação à partícula de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Dessa forma, a esteatose hepática é considerada uma das principais causas da doença hepática crônica (ANDRONESCU, 2018; MANNE, 2018; MONTESANO et al., 2020).

Além da esteatose hepática, a DHGNA também abrange outras doenças do fígado, como por exemplo, esteatohepatite, fibrose hepática, cirrose, podendo evoluir para carcinoma hepatocelular. A DHGNA pode ser subdividida em dois tipos, sendo: I- esteatose hepática não alcoólica (NAFL) e, II- esteatohepatite não alcoólica (NASH) (OLIVEIRA et al., 2021; MOCTEZUMA-VELÁZQUEZ, 2018).

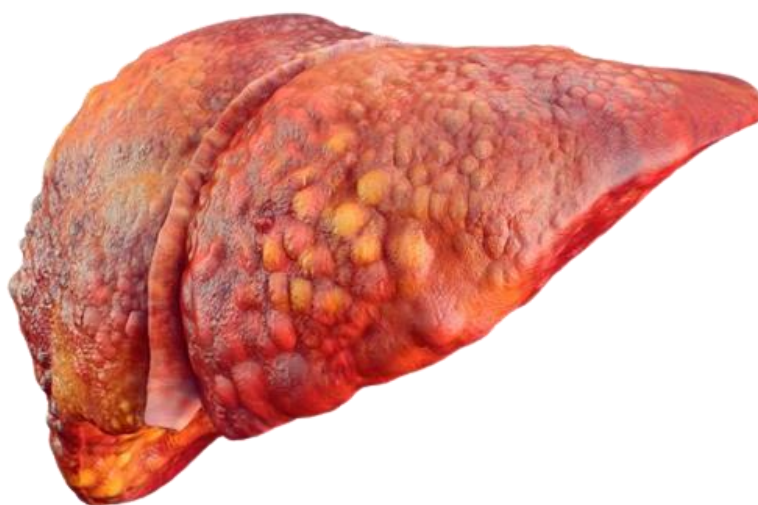


Figura 1. Fígado com presença de esteatose hepática (imagem disponível em: <https://clinicapopmed.com.br/esteatose-hepatica/>).

O diagnóstico de NAFL é definido quando o acúmulo de gordura hepática for maior ou igual a 5% do peso total do órgão. Essa doença pode ser desencadeada quando um ou mais processos metabólicos encontram-se alterados, tais como a captação, síntese, oxidação e transporte de lipídios hepáticos (PENG et al., 2018).

A esteatose hepática tem atraído interesse da comunidade científica devido sua crescente prevalência na população mundial, onde fatores de risco associados à resistência à insulina (RI), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade, dislipidemias (DLP), síndrome metabólica (SM), complicações cardiovasculares e toxicidade hepática induzida por drogas podem exercer efeito negativo isoladamente ou de modo sinérgico. Além disso, a faixa etária da população que apresenta maior prevalência da doença é entre 40 e 50 anos de idade (SCHWARZ et al., 2017).

Recentemente, propuseram uma nova nomenclatura para a DHGNA, isto é, doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), colocando a disfunção metabólica como um fator em destaque para a doença hepática (ENG & ESTALL, 2021; ESLAM et al., 2020).

Estudos realizados nos últimos cinco anos mostram que 25% da população mundial possui NAFL (JIANG, 2023). No Brasil, o cenário epidemiológico parece seguir um perfil semelhante ao mundial. O estudo epidemiológico multicêntrico de COTRIM et al. (2011), realizado no Brasil, identificou a prevalência de obesidade em 44,7% dos pacientes, sobrepeso em 44,4%, hiperlipidemia em 66,8%, DM em 22,7% e SM em 41,3%. Além disso, dentre os avaliados pelo estudo, a maioria era do sexo masculino, assintomático, com idade média de 50 anos. Ademais, foi realizada a biópsia hepática em 437 dos participantes, sendo detectada a esteatose hepática não alcoólica em 41,7% deles.

De acordo um estudo realizado a partir da coorte Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-BRASIL), onde uma amostra de 305 indivíduos, os quais a partir do exame de ultrassonografia hepática todos tiveram o diagnóstico de NAFL, sendo 60% dos participantes portadores do estágio leve da doença, 36% do estágio moderado e 4% grave (PEREIRA et al., 2021).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA ESTEATOSE HEPÁTICA

A esteatose hepática é um distúrbio metabólico complexo, que envolve fatores hormonais, genéticos e nutricionais. Tal condição clínica caracteriza-se pelo acúmulo de AG não esterificados (AGNE) no fígado advindos da ingestão direta de gorduras, transportados para o fígado incorporados aos quilomícrons, e/ou da síntese endógena a

partir de carboidratos simples, que são convertidos em AG via ativação da DNL e/ou ainda, a partir da lipólise dos TG advindos do tecido adiposo (TA). O aumento na incorporação de AGNE no fígado provocará a ativação da síntese de TG. Em situações de desequilíbrio metabólico, o aumento de TG se sobreporá a sua excreção incorporado à VLDL e oxidação via β -oxidação, favorecendo seu acúmulo no tecido hepático (**Figura 2**) (MOORE, 2019).

O processo da β -oxidação acontece majoritariamente, nas mitocôndrias e nos perossixomos. Tal processo é a principal via de metabolização dos AG. Com a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- α), amplamente expresso no fígado, ocorrerá a transcrição de diversos genes que estão interligados à β -oxidação, promovendo a redução de níveis de lipídeos no tecido hepático. Dessa forma, o PPAR- α é responsável pelo transporte de colesterol e TG do fígado para os tecidos extra-hepáticos na forma de VLDL (CHEN et al., 2023).

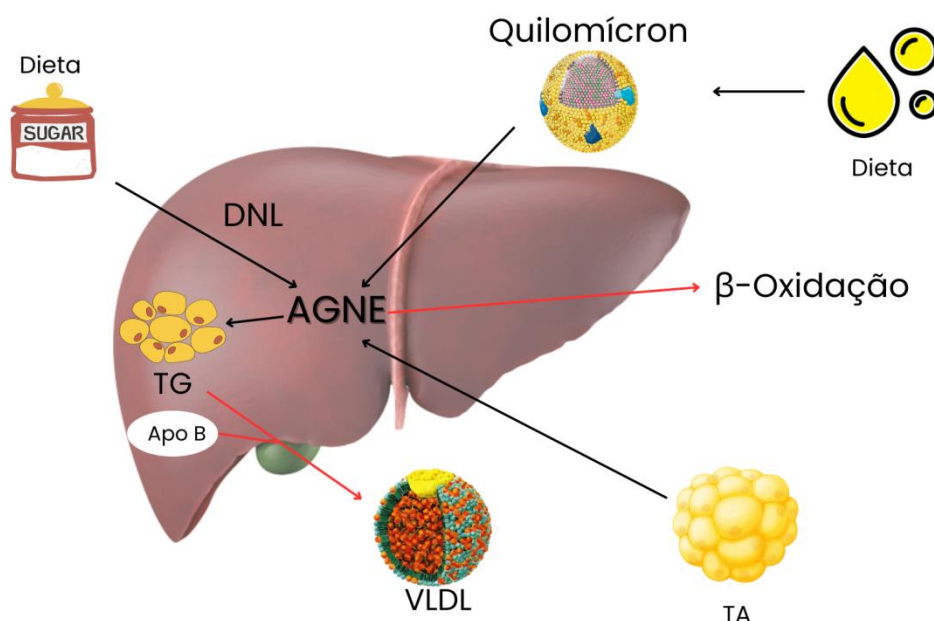


Figura 2. Hipótese fisiopatológica da NAFL (imagem elaborada pela autora).

O consumo calórico em excesso, tanto por dietas hiperlipídicas quanto por dietas hiperglicídicas, apresentam associação entre a NAFL e a RI. Esta, à nível hepático, caracteriza-se pela ocorrência da gliconeogênese e também pela redução da síntese de glicogênio pelo fígado (JUANOLA, 2021; SOFTIC et al. 2020).

A obesidade decorrente do excesso de calorias consumidas promove disfunção do tecido adiposo (TA), sendo esse responsável por armazenar energia na forma de TG. Dessa forma, o excesso de calorias contribui para a hipertrofia e hiperplasia do TA, favorecendo o processo inflamatório local crônico e de baixa intensidade, que se amplia com o desenvolvimento da RI, a qual é responsável pelo efluxo de AGNE para o fígado, contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática (ALLARD, 2019; BRUNT et al., 2015; MANNE, 2018; MOORE, 2019; SCHATTENBERG, 2011).

O excesso de AGL promove o acúmulo excessivo de gordura no fígado, por meio de sua captação via circulação portal, tornando-o mais suscetível a processos oxidativos e inflamatórios, e impactando negativamente na fisiopatologia do NAFL, NASH, fibrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC) (**Figura 3**) (JAHN, 2016; MOORE, 2019).

A NASH é, clinicamente, a forma mais grave da DHGNA, pois há a associação da presença da esteatose hepática com processos inflamatórios, lesão e apoptose dos hepatócitos, que em casos mais extremos da doença e em conjunto com o tratamento inadequado, pode levar ao desenvolvimento de fibrose, cirrose e câncer no fígado (RAZA, 2021). A fibrose hepática, por sua vez, acontece decorrente a resposta da cicatrização do tecido hepático devido a alguma lesão crônica associada com o acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC) (LAFOZ, 2020; PELLICORO, 2014). A cirrose hepática é caracterizada pela presença de uma fibrose extensa, além de também desenvolver nódulo de caráter regenerativo (CAUSSY et al., 2017; DIEHL & DAY, 2017). O CHC, por sua vez, é um tumor maligno decorrente da piora clínica da cirrose hepática ou após infecção crônica por hepatite B (LIAO et al., 2023).

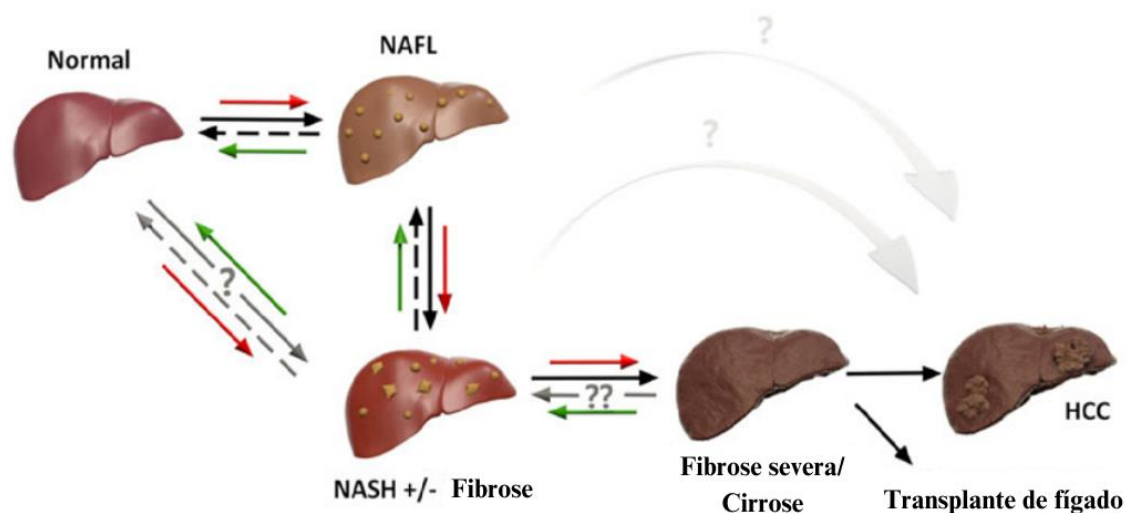


Figura 3. Desenvolvimento e progressão da DHGNA. A presença de gordura no tecido hepático faz parte da fisiologia do fígado e, até certo ponto, as condições clínicas de NAFL, NASH e fibrose são consideradas reversíveis como indicado nas setas tracejadas. A seta vermelha indica o desenvolvimento e progressão da doença a partir da má nutrição; já a seta verde indica a perda de peso e uma dieta saudável como formas de tratamento da NAFLD. Ainda há o questionamento se a esteatohepatite é um processo adaptativo independente da esteatose e se o carcinoma hepatocelular (HCC) pode se desenvolver diretamente de NAFL e NASH sem desenvolver fibrose (MOORE, 2019; adaptação).

Embora os marcadores inflamatórios contribuam para o desenvolvimento da esteatose hepática, alguns polimorfismos têm atraído a atenção dos pesquisadores por se associarem positivamente com a progressão da doença e desfechos clínicos menos favoráveis. O fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) é um hormônio peptídico, que está associado com a homeostase metabólica. O FGF21 está diretamente relacionado com a regulação da glicose hepática e metabolismo lipídico, tendo como principais efeitos aumentar a captação de glicose no TA e oxidação de AGNE pelo tecido hepático, sendo importante na prevenção da lipotoxicidade hepática (FISHER & MARATOS-FLIER, 2016; WILLIS et al., 2020).

Além do FGF21, destaca-se também a fosfolipase 3 associada à patatina (PNPLA3), a qual exerce função lipolítica em relação aos TG. No entanto, o polimorfismo na PNPLA3, caracterizado pela substituição da metionina pela isoleucina no gene 148 (*I148M*), promoverá o acúmulo de TG no fígado, podendo causar inflamação, fibrose e cirrose hepática. Sendo assim, indivíduos que possuem esse

polimorfismo, associado a um consumo exacerbado de carboidratos, isto é, dietas ricas em sacarose se associarão ao acúmulo de proteínas inibidoras da lipólise de TG na superfície das gotículas de lipídeos e, conseqüentemente, haverá acúmulo de TG do tecido hepático (BASURAY, 2017; BASURAY, 2019; DELLA PEPA, 2017; WANG, 2019). Estudo de associação genômica (GWAS), realizado com participantes hispânicos, afroamericanos e europeus americanos, no Dallas Heart Study, em 2008, foi a primeira evidência sobre a relação do PNPLA3 e a NAFL (DONG, 2019).

Também é importante ressaltar sobre o membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6 (TM6SF2), o qual é uma proteína responsável pela secreção hepática da VLDL. A mutação da variante *E167K* promove a perda da função da TM6SF2, favorecendo o acúmulo de gordura no fígado, na forma de TG, a partir da diminuição da secreção de VLDL, ocasionando em complicações no organismo, desde esteatose até cirrose (KOLZILITINA et al., 2014; LUO et al., 2022; SMAGRIS, 2016).

1.3 ASPECTOS NUTRICIONAIS

A alimentação exerce importante papel na fisiopatologia da esteatose hepática, estando as dietas hipercalóricas ricas em lipídeos e/ou carboidratos associadas ao seu desenvolvimento. Esses padrões dietéticos caracterizam-se pelo excessivo consumo de gorduras saturadas, frutose, carboidratos simples, isto é, cereais refinados, açúcares e doces, se contraponto à baixa ingestão de fibras alimentares (KANG et al., 2021). Dessa forma, as recomendações de consumo de gorduras saturadas de 7-10% do valor energético total (VET); substituição no consumo de carboidratos simples por complexos, isto é, reduzir a ingestão de alimentos com alto índice glicêmico; e aumento na ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) das séries ômega-6 e ômega-3 parecem ser efetivos na prevenção e manejo da esteatose hepática (DELLA PEPA et al., 2017; MOORE, 2019).

Entretanto, de acordo com Yki-Järvinen (2015), as dietas hipocalóricas diminuem o teor de gordura no fígado. Tanto uma dieta hiperlipídica e com baixo teor de carboidratos, quanto uma dieta hipocalórica, porém esta rica em carboidratos, parecem ser eficazes quanto à diminuição do tamanho do fígado, uma vez que favorece a mobilização do glicogênio hepático; fato que estimula o aumento na relação entre percentual de gordura e peso do tecido hepático.

1.3.1 DIETAS HIPERLIPÍDICAS

Entre as décadas de 1920 e 1930, como alternativa ao jejum e com o intuito de reduzir a ocorrência de convulsões em crianças com epilepsia, originou-se a dieta cetogênica, assim chamada devido à intensa síntese de corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e beta-hidroxibutirato) induzida pelo alto consumo de AG de cadeia longa (ANEKWE, 2020). Apesar desse marco histórico, atualmente, as dietas hiperlipídicas têm sido usadas no manejo de inúmeras condições clínicas (câncer, esclerose múltipla, epilepsia e obesidade) (DYNKA, 2022; TAO, 2022).

A cetose é obtida quando a ingestão diária de carboidratos é inferior a 50 gramas, estando associada ao consumo restrito ou não de gorduras e calorias. Dessa forma, a composição das dietas hiperlipídicas caracteriza-se pelo alto teor de gorduras (> 60%), baixo teor de carboidratos e quantidade adequada de proteínas (0,8-1,0 g/Kg de peso corporal) que preservem a massa corporal magra do indivíduo, porém baixa o suficiente para manter a cetose. Esse padrão dietético induz a rápida utilização do glicogênio corporal; fato que estimula a intensa síntese de corpos cetônicos, que passam a ser o principal substrato energético corporal (ANEKWE, 2020; GUPTA, 2017; WILSON & LOWERY, 2017).

Embora o uso das dietas hiperlipídicas seja descrito como estratégia para perda de peso corporal, controle de convulsões, câncer e algumas doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e Epilepsia, o uso dessas dietas está associado a efeitos colaterais, como por exemplo, DLP, RI, esteatose hepática e fibrose hepática (GARROW et al., 2011; ZHANG et al., 2018). Nosso grupo tem tido especial interesse na modulação das vias lipídicas, inflamatórias e oxidativas associadas ao consumo regular das dietas hiperlipídicas, apesar dos benefícios clínicos frente à doença primária – epilepsia (LIMA, 2015; PRUDENCIO et al., 2017).

Considerando que o fígado é um dos principais órgãos envolvidos no metabolismo lipídico, seja por sua capacidade oxidativa, de síntese, armazenamento e biotransformação, é plausível que o uso de dietas hiperlipídicas possa influenciar o desenvolvimento da esteatose hepática (YOUNOSSI, 2019). Essa hipótese encontra-se amplamente controversa na literatura, podendo ser alvo de grande interesse da Nutrição e de outras áreas da saúde.

O excesso do consumo de gorduras contribui, tanto para a obesidade, quanto para a SM. Tal padrão alimentar irá estimular uma maior deposição de gorduras em tecidos que não são adiposos, destacando o fígado (LIAN, 2020).

As dietas hiperlipídicas apresentam efeitos distintos a depender da composição lipídica, isto é, dietas com alto teor de ácidos graxos saturados (AGS) se associam à maior prevalência de obesidade e esteatose hepática. No entanto, quando o padrão alimentar é composto pelo elevado teor de PUFA, esses ácidos graxos promovem melhoria na sensibilidade à insulina e reduzindo a NAFL, quando comparado às dietas ricas em AGS (MANNE, 2018).

1.3.2 DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES

No contexto da esteatose hepática, outros nutrientes têm também demonstrado efeito negativo, destacando-se as dietas ricas em carboidratos e, particularmente aquelas com elevado conteúdo de carboidratos simples como sacarose e frutose.

De modo bastante questionável, até recentemente, uma dieta rica em carboidratos e baixa em gorduras era vista como uma forma de prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) em pacientes com DM2, sendo usada como justificativa que essa dieta não elevaria a glicose plasmática de jejum e seria capaz de auxiliar na diminuição do colesterol sérico (HOOPER, 2020). Contudo, devido à predisposição desses indivíduos a desenvolverem doenças metabólicas, como a obesidade, observa-se também efeitos negativos como a elevação de glicose pós-prandial, hiperinsulinemia e as DLP (JUNG & CHOI, 2017; SCHOLL, 2012).

Mais recentemente, diversos os estudos têm mostrado que padrões alimentares com altos teores de carboidratos são prejudiciais à saúde, pois estão associados com o desenvolvimento da SM (KOSINSKI & JORNAYVAZ, 2017). De acordo com Hall (2017), dietas com um alto teor de carboidratos promovem aumento de peso por estimularem a secreção de insulina, com conseqüente conversão do excesso de glicose e frutose em AGNE, aumento no armazenamento de TG no TA e infiltração dos AGNE no tecido muscular e hepático. Além disso, esses eventos favorecem a fome e o aumento do apetite, com isso o metabolismo é suprimido, promovendo um balanço energético positivo, e estímulo ao desenvolvimento da obesidade e DCV (BROUNS, 2019).

1.3.3 DIETA RICA EM FRUTOSE

A associação da glicose plasmática pós-prandial elevada com o aumento das concentrações de insulina promove a ativação da proteína de ligação do elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c) e da proteína de ligação de elemento responsiva a carboidratos (ChREBP) nos adipócitos e hepatócitos, estimulando a expressão de enzimas lipogênicas envolvidas na DNL. Desse modo, eleva-se a produção de AGS, principalmente ácido palmítico, que se associa com o desenvolvimento da RI e, conseqüentemente, há o desbalanço de diversas vias metabólicas associadas aos lipídeos e carboidratos (WORM, 2020).

De acordo com o estudo de Austin (2011), baseado nos dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES, 1971-2006), a redução na porcentagem de gorduras na dieta de 36,6% para 33,7% e o conseqüente aumento no consumo de carboidratos promoveu uma elevação de 44,0% para 48,7% - padrão alimentar *high-carb low-fat* (HCLF), se associou com o aumento do índice de massa corporal (IMC) na população americana.

Na última década, devido a uma maior expansão da produção, disponibilidade e consumo de alimentos industrializados houve também uma maior ingestão de açúcares. O excesso no consumo de açúcares como sacarose e xarope de milho rico em frutose, tem apresentado associação robusta com o desenvolvimento da obesidade, a DHGNA e a RI, estando também relacionado ao estímulo da DNL hepática. Em contrapartida ao consumo de glicose, a frutose, ao ser ingerida, é, majoritariamente, metabolizada pelo fígado, sendo assim, um componente mais sensível à lipogênese (TER HORST & SERLIE, 2017).

A frutose ingerida é transportada via portal para os hepatócitos por meio dos transportadores de glicose 2 e 8 (GLUT2 e GLUT8). Após captação hepática, essa é fosforilada no carbono 1 por meio da ação da enzima cetohecoquinase C (KHK-C), sendo convertida em gliceraldeído 3-fosfato, que será utilizado para a síntese de AG e, conseqüentemente, TG e VLDL, que ficam parcialmente armazenados no tecido hepático. O papel negativo da frutose no metabolismo lipídico é ampliado pela inibição da β -oxidação, uma vez que essa modula a atividade do nucleotídeo trifosfato de adenosina (ATP), e das enzimas citrato liase (ACLY) e acetil-CoA carboxilase (ACC-

1), levando ao acúmulo de AGNE no fígado. Além disso, a DNL requer ATP para a síntese de lipídeos a partir de carboidratos dietéticos, como por exemplo, a frutose. No entanto, para a enzima KHK-C fosforilar a frutose em frutose-1-fosfato, também será necessária a utilização de ATP, sendo parte dessa consumida a partir desse processo. Como forma de suprir a diminuição de ATP, será necessária a produção e utilização de difosfato de adenosina (ADP), a qual será convertida em monofosfato de adenosina (AMP) e, conseqüentemente, convertida em monofosfato de inosina (IMP). Esta produzirá purinas, que a partir da xantina oxidase (XO) irá promover a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais irão desencadear reações oxidativas e até mesmo maior inflamação do tecido (**Figura 4**) (MURIEL, 2021).

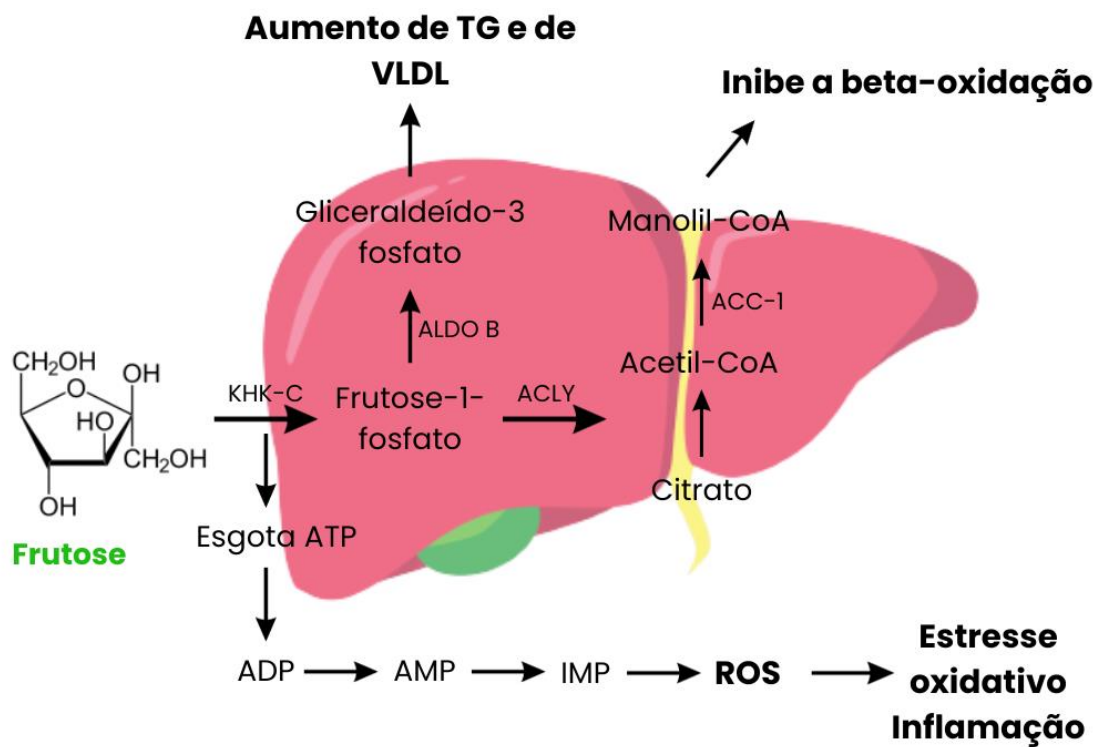


Figura 4. Metabolismo da frutose no fígado (imagem elaborada pela autora).

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto do consumo excessivo de frutose e dieta hiperlipídica na modulação do metabolismo lipídico, inflamação e desenvolvimento da esteatose hepática.

3. METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de intervenção baseado em modelo experimental com seguimento de 100 dias.

3.2 TAMANHO AMOSTRAL E DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo contou com um tamanho amostral de 18 animais distribuídos em 3 grupos compostos por 6 animais por grupo experimental. O cálculo amostral baseou-se em estudos prévios da literatura com objetivos semelhantes, que utilizaram para as análises estatísticas uma amostra final de cerca de 5 animais por grupo de intervenção (DUSTIN & STAFSTROM, 2016; DING et al., 2016).

A amostra foi composta por ratos da espécie *Wistar*, machos, adultos jovens, isto é, com cerca de 7 semanas e com peso variando de 200-300 gramas. Os 3 grupos foram distribuídos, conforme descrito na **Figura 5**:

Dieta Controle (DC), n=6 - ração padrão para ratos de laboratório (Nuvilab®);

Dieta Frutose (DF), n=6 – ração padrão para ratos e água com 30% de frutose;

Dieta Hiperlipídica (DH), n=6 – ração hiperlipídica rica em gorduras saturadas.

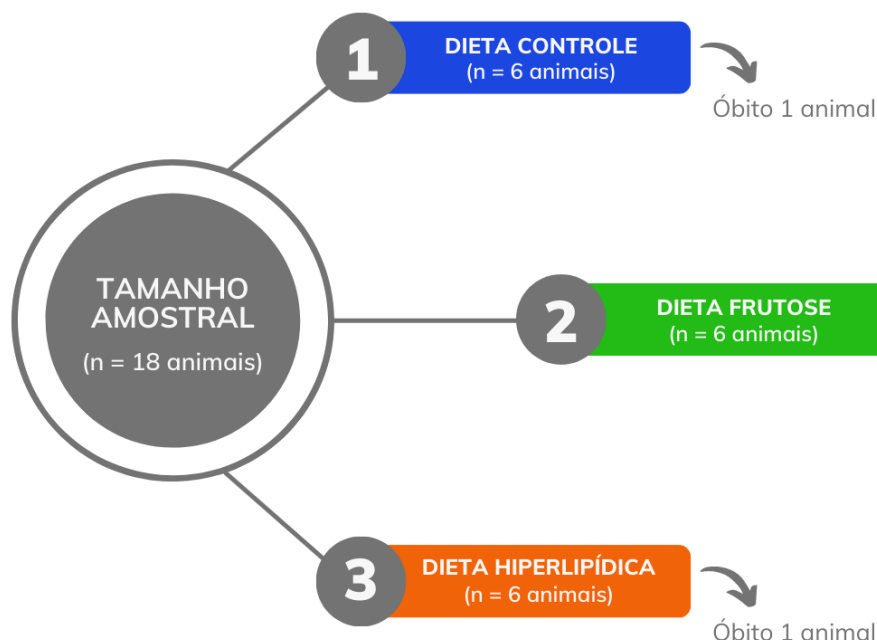


Figura 5. Fluxograma do tamanho amostral do estudo.

3.3 ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos em ciclo luz/escuro de 12h e foram distribuídos em pares em gaiolas apropriadas no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical (IMT), da Faculdade de Medicina (FMUSP) e com temperatura controlada em 22°C, visando garantir o efeito ninhada e condições adequadas de bem-estar animal.

3.4 FORMULAÇÃO DAS DIETAS

As dietas e água foram administradas *ad libitum*, conforme sumarizado na **Figura**

6.

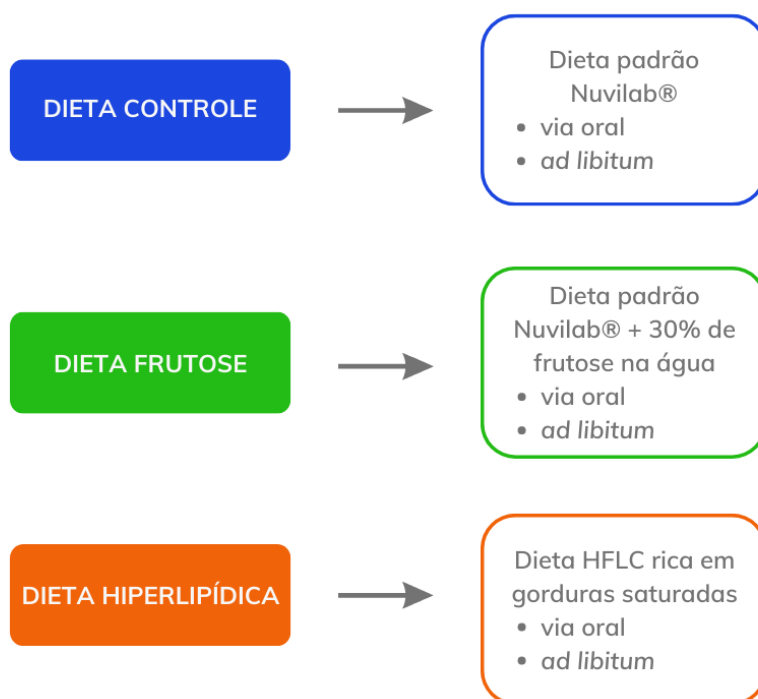


Figura 6. Descrição da oferta das dietas e da água, segundo grupos de intervenção.

Os animais dos grupos DC e DF foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR-1 (Quintia S/A), conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Descrição da composição nutricional da ração Nuvilab CR-1 (Brasil, Chapecó, SC).

| NUTRIENTES | | NUTRIENTES | |
|-------------------------|-------------|------------------------------|------------|
| <i>Proteínas brutas</i> | 220 g/Kg | <i>Vitamina B2</i> | 6 mg/Kg |
| <i>Extrato etéreo</i> | 50 g/Kg | <i>Vitamina B6</i> | 7 mg/Kg |
| <i>Material mineral</i> | 90 g/Kg | <i>Vitamina B12</i> | 22 mcg/Kg |
| <i>Fibra bruta</i> | 70 g/Kg | <i>Niacina</i> | 60 mg/Kg |
| <i>Cálcio</i> | 10-14 g/Kg | <i>Pantotênico de cálcio</i> | 21 mg/Kg |
| <i>Fósforo</i> | 600 mg/Kg | <i>Ácido fólico</i> | 1 mg/Kg |
| <i>Vitamina A</i> | 13000 UI/Kg | <i>Biotina</i> | 0,05 mg/Kg |
| <i>Vitamina D3</i> | 2000 UI/Kg | <i>Colina</i> | 1900 mg/Kg |
| <i>Vitamina K3</i> | 34 UI/Kg | <i>BHT</i> | 100 mg/Kg |
| <i>Vitamina B1</i> | 3 mg/Kg | <i>Calorias</i> | 295 kcal |

A DH foi baseada no padrão para crescimento de roedores (AIN-93G) (REEVES et al., 1993). Além disso, a recomendação em relação ao conteúdo de fibras, vitaminas, minerais, L-cistina, colina e tert-butil-hidroquinona (BHA) foram mantidos de acordo com a AIN-93.

No entanto, a fonte proteica recomendada pela AIN-93G, a caseína, foi substituída pela ovoalbumina liofilizada (P. R. Netto Indústria de Alimentos Ltda, São Paulo-SP), pois essa confere melhor estrutura e maleabilidade dietética à produção das rações experimentais.

A principal fonte de carboidratos utilizada foi a farinha de amendoim Geração Saúde® (Geração Saúde Ltda, Bento Gonçalves-RS). Contudo, para o preparado das rações de transição, 1:1 e 2:1, foi utilizado amido de milho Yoki® (Yoki Distribuidora de Alimentos Ltda, Cajamar-SP), para complementar o conteúdo de carboidratos.

As fontes de lipídios utilizadas para a produção da DH foram as seguintes: manteiga Italac® (Goiasminas Indústria de Laticínios Ltda, Girua-RS), banha de porco Frimesa® (Frimesa Cooperativa Central, São Paulo-SP), óleo de coco Copra® (Copra Indústria Alimentícia Ltda, Maceió-AL) e óleo de soja Liza® (Liza Comércio de Alimentos Ltda, Belo Horizonte-MG).

A L-cistina, o bitartarato de colina, o mix de minerais AIN-93G, o mix de vitaminas e o fosfato de potássio foram adquiridos pela empresa *Prag Solutions*

especializada em rações e produtos para rações animais (Domeneghetti & Correia Ltda, Jaú-SP). Optou-se por utilizar o dobro das recomendações de vitaminas, em relação à AIN-93, visando preservar seu conteúdo ao longo do processo de produção, assim como reforçar a proteção antioxidante da ração como um todo devido ao elevado conteúdo de gorduras oxidáveis. O fosfato de potássio utilizado complementou as fontes de fósforo e potássio disponíveis pela composição da albumina do ovo, pois essa apresenta menor concentração destes nutrientes quando comparada à caseína. Já o antioxidante BHA, foi fornecido pela Labsynth® (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda (Diadema-SP). A celulose foi adquirida pela empresa Minérios Ouro Branco (São Paulo-SP).

Todas as rações foram produzidas no Laboratório e Cozinha Didática de Procedimentos e Técnicas Culinárias Aplicadas à Nutrição, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP).

O BHA foi pesado em balança digital com 100mg de precisão e limite de capacidade de 4200g (Shimadzu® UX4200H) (Shimadzu do Brasil, Barueri-SP). Em seguida, os ingredientes foram misturados com auxílio de um liquidificador Philco® PH 900 (Philco Eletrônicos AS, Manaus-AM) em uma sequência padronizada de acréscimo dos ingredientes.

Após essa etapa, as dietas foram assadas em forno elétrico (Layr Luxo 2400W, Layr Eletrodomésticos, São Paulo-SP) em temperatura de 100°C durante 15 minutos. Posteriormente, as rações foram cortadas em pequenos cubos (2,0 x 2,0 x 1,0 cm – largura x comprimento x altura), sendo, em seguida, congeladas e liofilizadas (Freeze Dryer Operon, Korea) por cerca de cinco horas. Após a liofilização, as dietas retornaram ao congelador e, posteriormente, foram pesadas e embaladas em pacotes contendo cerca 60g de ração por embalagem e selados duplamente a vácuo em filme plástico de alumínio (Seladora TM 150, TecMaq, São Paulo-SP). As rações foram armazenadas em freezer a -30°C até o momento do consumo pelos animais.

A composição teórica das rações foi estimada a partir de dois softwares, o Dietbox® (Dietbox informática Ltda, Porto Alegre-RS) que contém informações nutricionais reunidas de diversas tabelas brasileiras de composição de alimentos: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da TACO (NEPA, 2011), Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TBCA, 2020), Tabela de Composição de Alimentos:

Suporte para decisão nutricional (Philippi, 2002) e as tabelas de composição de alimentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) e a tabela americana do *United States Department of Agriculture* (USDA) (EUA, 2012); e o The Food Processor® (Esha Research, Salem-EUA, 2023), que traz tabelas de composição de alimentos dos Estados Unidos, principalmente da tabela da USDA, mas também alimentos nacionais que foram inseridos à critério dos pesquisadores.

Os animais que fizeram parte do grupo DF consumiram ração comercial destinada para animais de laboratório (Nuvilab®), *ad libitum*, porém a água ofertada foi enriquecida com 30% de frutose (Labsynth® Produtos para Laboratório Ltda).

A frutose diluída a 30% foi preparada em água filtrada e armazenada em câmara fria a 4°C até ser fornecida aos animais. A preparação da solução com frutose e troca de água ocorreu a cada 2 dias, a fim de evitar o desenvolvimento de microorganismos e oxidações.

3.5 MONITORAMENTO DOS ANIMAIS

Com base na administração das rações e períodos de monitoramento, o protocolo de intervenção foi distribuído, conforme descrito na **Figura 7**.

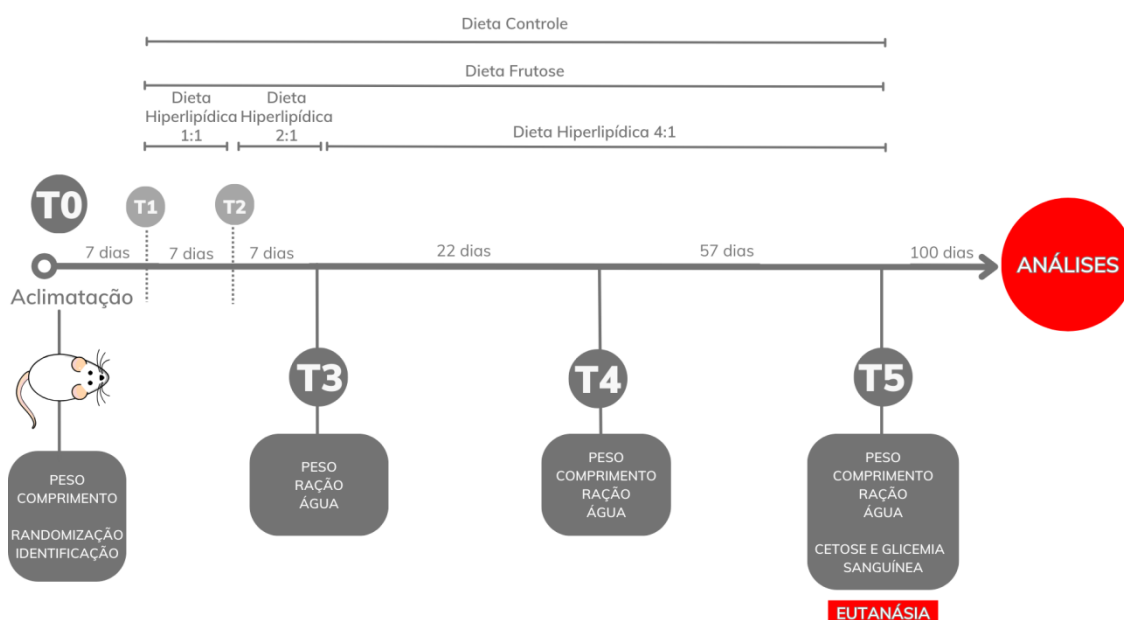


Figura 7. Escala temporal de monitoramento dos animais ao longo do experimento.

O monitoramento foi realizado nos seguintes momentos e todas as fases de controle dos animais seguiram procedimentos padronizados, conforme protocolos e

fichas estruturadas previamente definidas para monitorar todos os parâmetros (Apêndices 1 e 2).

3.5.1 PESO CORPORAL

O monitoramento de peso dos animais ocorreu em 6 momentos: tempo basal (T0), T1, T2, T3, T4 e T5. Para a pesagem dos animais utilizou-se balança digital SF-400 (Wellmix®), com capacidade de 10 kg e precisão de 0,1 g, sendo considerado o peso médio de três medidas realizadas em cada momento do estudo.

3.5.2 COMPRIMENTO NASOCAUDAL

O comprimento dos animais foi realizado a partir da fixação de uma régua de 30 cm a uma área plana e lisa. Os animais foram posicionados de modo paralelo à régua, imobilizando-o desde a ponta do nariz até o início da cauda, deixando-o o mais rente possível à mesa. A medição foi realizada em triplicata e em 3 momentos do estudo (T0, T4 e T5).

3.5.3 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DAS RAÇÕES E ÁGUA

O monitoramento do consumo das rações e da água foi realizado em 5 momentos (T1, T2, T3, T4 e T5). Para a pesagem das rações utilizou-se balança digital SF-400 (Wellmix®), com capacidade de pesagem de 10 kg e precisão de 1,0 g. Cada momento de monitoramento foi representado pela média da coleta de dados de 3 dias consecutivos e realizada sempre no período da tarde.

3.5.4 AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA NUTRICIONAL

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) foi calculado com base na relação entre o ganho de peso (g) e o consumo total de dieta pelos animais (g). A partir disso foi possível também realizar o cálculo do CEA por calorias, isto é, a relação do consumo total de dieta (ração + frutose) na forma de calorias dividido pelo peso do animal (g).

O consumo da frutose baseou-se na proporção de 30 g para cada 100 mL (30%). A quantidade em gramas de frutose consumida variou, conforme o consumo de água por cada animal. A partir do consumo em gramas foi possível obter a quantidade de calorias ingeridas, isto é, 4 calorias para cada 1 g de frutose ingerida. O consumo calórico do grupo DF foi baseado na soma entre a DP consumida e a frutose ingerida por meio da água.

3.5.5 AVALIAÇÃO DA CETOSE E GLICOSE NO SANGUE

A avaliação da cetose e glicose sanguínea foram realizados no momento final (T5) do experimento. Para tais medições foram utilizadas fitas de química seca de cetose Freestyle Optium Cetona® e de glicemia Freestyle Optium®, ambas quantificadas por meio do aparelho digital Freestyle Optium Neo® (Abbott, SP). A concentração de glicose foi expressa em mg/dL e a cetose em mmol/L.

3.5.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

O método utilizado para a eutanásia dos animais foi a decapitação com guilhotina. Tal método oferece rápida perda de consciência e ausência de alterações químicas decorrentes do uso de métodos químicos para o sacrifício. Anterior à decapitação, o animal foi mantido em uma câmara, devidamente vedada, contendo gás carbônico (CO₂) para prévia sedação (3,0 minutos).

3.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOQUÍMICAS

3.6.1 SANGUE

Após jejum de 8-12 horas, no momento final (T5), as amostras de sangue foram coletadas após a decapitação. O sangue foi coletado em tubos *vacuntainer* contendo ácido etilenodiaminotetraacético – EDTA (1,0 mg/mL), utilizado como anticoagulante e antioxidante, mantido em geladeira à 4°C até obtenção do plasma e hemoconcentrado de hemácias.

Para obtenção do plasma, as amostras foram processadas em centrífuga a 3000 rpm, por 15 min, em temperatura a 4°C no Laboratório de Bioquímica da Nutrição

Aplicada às Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) da FSP-USP. Posteriormente, acrescentou-se os inibidores de proteases, aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM). Todas as amostras foram alíquotadas, segundo volume e tipos de análises a serem realizadas. Até o momento das análises, as amostras ficaram armazenadas a -80°C.

3.6.2 FÍGADO

Após o sacrifício dos animais, o fígado foi coletado, lavado com solução fisiológica, pesado em Balança digital com 100 mg de precisão e limite de capacidade de 4200g (Shimadzu® UX4200H) (Shimadzu do Brasil, Barueri-SP). O peso do fígado foi apresentado na forma absoluta (peso bruto) e relativa, isto é, após ajuste pelo peso do animal ao término da intervenção. Em seguida, o órgão foi dividido em 2 partes (lobo direito e lobo esquerdo + lobo médio), sendo a primeira parte armazenada em formaldeído à 10% e o restante congelado à -80°C. A figura abaixo demonstra os procedimentos realizados para obtenção do fígado após a eutanásia (**Figura 8**).

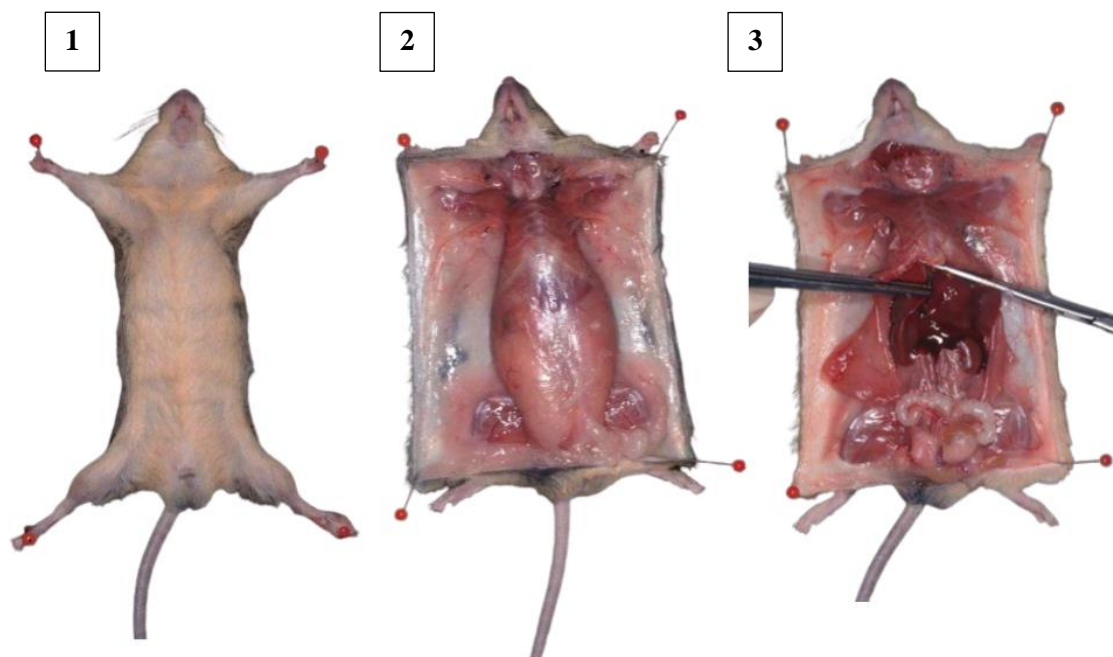


Figura 8. Procedimentos realizados após a eutanásia para obtenção do fígado. 1 – Posição do rato para a autópsia; 2 – Abertura da pele do animal; 3 – Ressecção do fígado (COVELLI).

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS NO PLASMA

3.7.1 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE

A glicose e frutose plasmáticas foram determinadas, conforme proposto por Adams *et al.*, (2008), usando o protocolo do kit analítico comercial de glicose / frutose modificado (Megazyme, Código - K-FRUGL; Xygen Diagnostics Inc., Burgessville, Ontário, Canadá). Primeiramente, pipetou-se 10 uL de amostra, sendo adicionado 10 uL do Reagente 1 e, em seguida, 10 uL do Reagente 2, e a placa foi agitada no leitor de microplaca SpectraMax M5 PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com o intuito de homogeneizar a amostra. Após 3 minutos em temperatura ambiente, foi feita a primeira leitura a 340 nm, onde identificou-se o branco. Em seguida, adicionou-se 2 uL do Reagente 3. A placa foi agitada novamente, e incubada a 30°C por 5 minutos na câmara aquecida do leitor de placas. Realizou-se a segunda leitura, sendo possível identificar a absorbância relativa à concentração de glicose da amostra. Após esta leitura, foram adicionados 2 uL do Reagente 4, sendo a reação homogeneizada e mantida a 30°C por 10 minutos. Realizou-se a terceira leitura, onde a concentração de frutose foi determinada. A curva padrão foi feita a partir de um padrão externo de D- (-) -Frutose (F0127, *Sigma-Aldrich*), composta por 9 pontos e concentração máxima de 1 mg/mL. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, bem como o branco e os pontos da curva padrão. Utilizou-se a média das absorbâncias aplicada à curva padrão para fins de cálculo da concentração de frutose e glicose.

Realizou-se a análise no Laboratório de Bioquímica Aplicada às DCNT da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) e o coeficiente de variação aceito foi $\leq 15\%$.

3.7.2 ENZIMAS HEPÁTICAS

Foram realizadas as análises das enzimas hepáticas – alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA), utilizando métodos validados e kits comerciais. Estas análises foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC/FMUSP). O coeficiente de variação aceito foi $\leq 15\%$.

3.8 ANÁLISES NO TECIDO HEPÁTICO

3.8.1 EXTRATO AQUOSO HEPÁTICO

A partir de 200 mg de tecido hepático foi preparado um homogenato aquoso por meio da adição de 2,0 mL de tampão RIPA (Sigma Aldrich®). A este homogenato acrescentou-se os inibidores de proteases aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM) e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM), além do antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM) para evitar oxidação e proteólise da amostra. Utilizou-se o desmembrador ultrassônico para o preparo do homogenato por cerca de 20 segundos por extrato. O extrato foi armazenado a -80°C até o momento das análises.

3.8.2 PROTEÍNAS TOTAIS

O conteúdo de proteínas totais do extrato hepático foi avaliado por meio do método baseado no ácido bicinconínico (BCA), utilizando o kit Pierce™ BCA (Protein Assay, Thermo Scientific™). A leitura da absorbância foi realizada a 562 nm a partir do espectrofotômetro, após incubação a 37°C por 30 minutos. A análise foi realizada em triplicata e a concentração de proteínas totais foi determinada em relação à curva padrão feita com albumina (0,4 a 2,0 mg/mL). Todos os parâmetros bioquímicos avaliados no tecido hepático foram normalizados pela concentração de proteínas obtida no extrato hepático.

A análise descrita acima foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Nutrição Aplicada às DCNT da FSP-USP e o coeficiente de variação aceito foi $\leq 15\%$.

3.8.3 PERFIL LIPÍDICO

As concentrações de colesterol total (CT) e TG presentes no tecido hepático foram detectadas com o auxílio de um espectrofotômetro calibrado à 500 nm e 505 nm. A reação foi analisada pelos kits comerciais CHOL2 e TRIGL (Labtest®, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG). Os resultados foram expressos em mg/dL.

A concentração de AGNE no extrato aquoso hepático foi determinada por meio do método colorimétrico e enzimático (NEFAS®, Randox Laboratories Limited, Reino Unido), sendo a concentração determinada em espectrofotômetro com detecção à 340 nm, sendo os resultados expressos em mg/dL.

Todas as análises descritas acima foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Aplicada às DCNT da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) e em triplicata, sendo o coeficiente de variação aceito $\leq 15\%$.

3.8.4 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O conteúdo de TBARS no extrato hepático foi determinado utilizando-se o método descrito por OHKAWA et al. (1979) com modificações. Ao extrato hepático preparado, conforme descrito no item 4.12 (300 µL), foi adicionado 1 mL de solução reativa formada pelo ácido tiobarbitúrico (0,046 M), ácido tricloroacético (0,92 M) e ácido clorídrico (0,25 M), sendo posteriormente, incubado em banho-maria fervente com agitação constante (100°C) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 400 µL de butanol em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 2500 rpm. Na sequência, foi realizada a leitura de 200 µL do sobrenadante a 535nm. A quantificação de TBARS foi realizada com base na construção de uma curva padrão formada por 1,1,3,3 tetraetoxipirano (TEP) (3,3 a 33,0 nmol/mL). Os valores foram expressos em nmol de TBARS/mg de proteínas.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo o coeficiente de variação aceito $\leq 15\%$. A análise descrita acima foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Nutrição Aplicada às DCNT da FSP-USP.

3.8.5 DETECÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

A concentração de citocinas pró-inflamatórias: Interleucina 1b (IL-1b), Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) foi avaliada por meio kit comercial da MILLIPLEX® Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay da Merck EMD Millipore (RECYTMAG-65K-04). As análises foram realizadas na Rede Premium (FMUSP). Todas as análises foram realizadas em duplicata. Para realização das análises, as amostras foram descongeladas e centrifugadas à 4500 rpm, em temperatura ambiente por 5 minutos. Para a construção da curva padrão e diluições (microesferas, amostras, anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina e soluções de lavagem) seguiu-se as instruções da bula dos kits. Foram pipetadas microesferas coloridas revestidas com anticorpos de captura contra os biomarcadores de interesse em uma placa com 96 poços. A seguir, foram pipetadas as amostras, a curva padrão, o branco e os bloqueadores (quando necessário) e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital), de acordo com as instruções das bulas dos kits utilizados. Após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por novo período de incubação. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II

Wash Station) e as microesferas permanecem retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, a estreptavidina-ficoeritrina, que emitirá sinal fluorescente quando excitado por diodo emissor de luz do equipamento de leitura, e incubada por um breve período. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços uma solução tampão para serem analisadas no equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, Texas, USA), onde 2 LEDs, um verde com comprimento de ondas de 525nm identifica os biomarcadores, e um LED vermelho (635 nm) identifica a microesfera, e uma câmera com dispositivo de carga acoplado, que captura essas imagens e envia para o software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, Texas, USA) e posterior análise dos dados é realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore).

As concentrações dos biomarcadores foram determinadas com base no ajuste da curva padrão para a intensidade média de fluorescência versus pg/mL. As concentrações das citocinas foram expressas em pg/mL de acordo com a curva padrão obtida no ensaio e, posteriormente, os valores foram expressos em pg/mg de proteínas totais do tecido hepático. O coeficiente de variação aceito foi $\leq 15\%$.

3.8.6 FOSFOLIPASE 3 ASSOCIADA À PATATINA (PNPLA3)

A concentração do PNPLA3 foi avaliada por meio do kit comercial da MYBIOSOURCE® específico para amostras de ratos (Cód. MBS4501951). Primeiramente, o padrão (10 ng/mL) foi reconstituído utilizando 1,0 mL do diluente padrão, mantido por 10 minutos em temperatura ambiente e agitado suavemente a fim de evitar formação de espumas/bolhas. Em seguida, preparou-se a curva padrão contendo 7 pontos em duplicada, incluindo o branco (0 ng/mL a 10 ng/mL). Amostras diluídas 1:2, padrões e brancos foram adicionados à placa, seguida de incubação por 90 minutos a 37 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL da Solução de Detecção A. A placa foi coberta com o selador de placas e incubada por 45 minutos a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com 300 µL em cada poço pela solução de lavagem em três ciclos manuais. A cada lavagem, o líquido restante foi completamente removido.

Adicionou-se 100 µL da Solução de Detecção B, cobriu novamente a placa com o selador e incubou por 45 minutos a 37 °C. Após essa etapa o sobrenadante foi

descartado e a placa foi lavada com 300 μL de solução de lavagem em cinco vezes, seguida da remoção do líquido e completa secagem em papel absorvente.

Sem exposição direta à luz, 90 μL do substrato foi adicionado, sendo a placa coberta por selador e incubada por 25 minutos a 37 °C. Após essa etapa, a reação foi bloqueada por meio da adição de 50 μL da solução de bloqueio e a leitura da placa foi realizada utilizando espectrofotômetro à 450 nm. As concentrações foram expressas em ng/mL e, posteriormente, ajustas pelas concentrações de proteínas totais do fígado.

A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica Aplicada às DCNT da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP).

4.8.7 MEMBRO 2 DA SUPERFAMÍLIA DA PROTEÍNA TRANSMEMBRANA 6 (TM6SF2)

A concentração da TM6SF2 foi avaliada por meio do kit comercial da MYBIOSOURCE® específico para amostras de ratos (Cód. MBS9343433). Primeiramente, a curva padrão (62,5 a 2000 pg/mL) as amostras e o branco foram incubados, juntamente com o anticorpo secundário conjugado com HRP por 60 minutos a 37 °C.

Após descarte do sobrenadante e lavagem da placa (4 ciclos), foi adicionado 50 μL do cromogênio A e 50 μL do cromogênio B, sendo este sem contato direto com a luz. Novamente, a placa foi coberta pelo selador de placas e incubada por 15 minutos a 37 °C. Após esta etapa, adicionou-se 50 μL do reagente de bloqueio e a leitura da placa foi realizada utilizando espectrofotômetro à 450 nm. As concentrações foram expressas em ng/mL e, posteriormente, ajustas pelas concentrações de proteínas totais do fígado.

A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica Aplicada às DCNT da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) e em duplicata, sendo o coeficiente de variação aceito de $\leq 15\%$.

3.8.8 FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 21 (FGF21)

A concentração do FGF21 foi avaliada por meio do kit comercial da MYBIOSOURCE® específico para amostras de ratos (Cód. MBS2516155). Primeiramente, foi centrifugado a 10000 g por 1 minuto o tubo contendo o padrão (2000 pg/mL), em seguida foi reconstituído utilizando 1,0 mL do diluente padrão, mantido por 10 minutos em temperatura ambiente e agitado suavemente a fim de evitar formação de

espumas/bolhas. Em seguida, preparou-se a curva padrão contendo 7 pontos em duplicada, incluindo o branco (0 pg/mL a 2000 pg/mL).

Além disso, foram preparados também dois outros reagentes. Para a solução de trabalho de detecção biotinizada, anteriormente, foi centrifugado a 10000 g por 1 minuto o tubo contendo o concentrado de detecção biotinizada e, em seguida, foi diluído 120 µL do deste (100 vezes concentrado) por 14 mL do diluente de detecção biotinizada. Para o preparo da solução de trabalho concentrada de conjugado HRP, utilizou-se 120 µL do conjugado HRP concentrado (100 vezes) para 14 mL do diluente de conjugado HRP.

Amostras diluídas 1:500, padrões e brancos foram adicionados à placa, sendo essa coberta pelo selador de placas, e depois incubada por 1 hora a 37 °C.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL da solução de detecção biotinizada. Novamente, a placa foi coberta pelo selador de placas e incubada por 45 minutos a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com 350 µL em cada poço pela solução de lavagem em três ciclos manuais. A cada lavagem foi removido completamente o líquido restante batendo a placa em papel absorvente.

Adicionou-se 100 µL da solução de trabalho de conjugado HRP, cobriu novamente a placa com o selador e incubou por 30 minutos a 37 °C. Após essa etapa o sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com 350 µL de solução de lavagem em cinco vezes. A cada lavagem foi removido completamente o líquido restante batendo a placa em papel absorvente.

Sem exposição direta à luz, 90 µL do substrato reagente foi adicionado, sendo a placa coberta por selador e incubada por 15 minutos a 37 °C. Após essa etapa, a reação foi bloqueada por meio da adição de 50 µL da solução de bloqueio e a leitura da placa foi realizada utilizando espectrofotômetro à 450 nm. As concentrações foram expressas em pg/mL e, posteriormente, ajustas pelas concentrações de proteínas totais do fígado.

A análise foi realizada no Laboratório de Bioquímica Aplicada às DCNT da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP) e em unicata.

3.9 ANÁLISE EXTRATO LIPÍDICO HEPÁTICO

3.9.1 EXTRATO LIPÍDICO

O extrato lipídico foi obtido a partir de 50 mg de tecido hepático, sendo acrescentado 3,0 mL de solução de KCl (0,1M), preparada com água milliQ. Em seguida, o tecido foi homogeneizado com o auxílio de um desmambrador ultrassônico

por cerca de 20 segundos, a fim de obter a dissolução total do tecido. Em seguida, foram acrescentados 2,0 mL de clorofórmio e 1,0 mL de metanol, seguida de agitação em vórtex por 1 minuto. O extrato obtido foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a fase inferior foi utilizada para a análise de ácidos graxos.

3.9.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A partir do extrato lipídico hepático (400 µL) foram adicionados 1,75 mL de metanol, 100 µL de cloreto de acetila e 50 µL de padrão interno, contendo 1 mg/mL de ácido tridecanóico (C13) em hexano. Os tubos vedados foram aquecidos a 100 °C por 60 min. Após esta etapa, adicionamos 1,5 mL de hexano e os tubos foram agitados em vórtex durante 1 min. As amostras foram então centrifugadas a 1500 rpm, por 2 min, a 4 °C (Hitachi® – Himac CR 21GII), e a fase orgânica (sobrenadante) foi coletada em tubos Falcon de 15 ml. Este procedimento de extração foi repetido por meio da adição de 0,75 mL hexano para otimizar a extração lipídica. A solução combinada de hexano foi evaporada no concentrador evaporador Centrivap resistente a ácidos (Lanconco®, modelo 7810016) por 20 min a 40 °C até à total evaporação dos solventes orgânicos. O resíduo seco foi ressuspensão com 300 µL de hexano com a utilização do banho ultrassônico (Elma®, modelo D78224) por 5 min. Após esta etapa, a solução foi filtrada utilizando filtros PVDV 0,22 µm (Analítica®, modelo 2202225100CW) e armazenada em *inserts* dentro de *vials* para análise posterior.

O perfil de ácidos graxos presente no tecido hepático foi determinado em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-2010), equipado com uma coluna capilar DB-FFAP (15 m x 0,100 mm x 0,10 µm 0 J e W Scientific, Agilent Technologies). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 0,27 mL/min, vazão de 35 cm/s e pressão de 187,8 kPa. O FID foi ajustado a 250°C. As taxas de fluxo de ar sintético, N₂ e H₂ foram, respectivamente, 300, 30 e 30 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente. A programação de temperaturas da coluna variou de 100 °C inicial, com retenção de 0,5 min, rampa de 25 °C/min a 195 °C, 3 °C/min a 205 °C, 8 °C/min a 230 °C, com retenção de 4 min, 50 °C/min a 245 °C, retendo por 0,5 min. A razão Split utilizada no injetor foi de 1:100 e o tempo de corrida total foi de 15,56 min. O volume de injeção foi de 2 µL, em injetor automático AOC 20i. Os ácidos graxos foram identificados por meio da comparação dos tempos de

retenção do padrão externo FAME (Supelco 37 Component FAME Mix; Sigma-Aldrich, Cód. CRM47885) com as amostras. O percentual de cada ácido graxo foi calculado em relação à área total dos ácidos graxos analisados a partir do cromatograma, utilizando-se a metodologia “valley to valley”, na qual os picos são integrados estabelecendo-se o ponto de início e final do vale entre os picos, como sendo a linha de base, sendo o resultado final obtido pela média das triplicatas de cada amostra. A integração foi realizada no software GC Solutions também fornecido pela empresa Shimadzu.

A análise descrita acima foi realizada no Laboratório de Componentes Alimentares e Saúde da FSP-USP e o coeficiente de variação aceito foi $\leq 15\%$.

3.10 HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO

A partir do tecido hepático armazenado no formol à 10%, foram confeccionadas lâminas (3-5 μm), seguida de coloração HE. A confecção das lâminas foi realizada pela empresa HistoCell e a análise das imagens foi realizada por médico patologista colaborador cego Dr. Luis Alberto de Pádua Covas Lage (FMUSP). Os parâmetros analisados foram os seguintes: 1- Infiltrado inflamatório; 2- Depósito de gordura; e 3- Necrose.

Para avaliar a presença de infiltrado inflamatório crônico foram analisadas células linfomononucleares por campo ($n=5$) de avaliação utilizando aumento de 50 vezes em microscópico óptico nas regiões de espaço porta (EP) e do parênquima hepático (P). Foi considerado infiltrado inflamatório leve (+), quando encontrado 0-5 linfócitos/campo; infiltrado inflamatório moderado (++) , quando encontrado 5-15 linfócitos/campo; infiltrado inflamatório intenso (+++), quando localizado 15 ou mais linfócitos/campo.

Para a análise de infiltração de gordura foi definido como ausência de gordura (0); infiltração gordurosa leve (+), quando a presença de gordura foi menor que 10% do parênquima hepático/ campo analisado com aumento de 10 vezes; infiltração gordurosa moderada (++) , quando houve a presença de gordura em 10-50% do parênquima hepático/campo analisado com aumento de 10 vezes; infiltração gordurosa intensa (+++), quando a presença de gordura for maior que 50% do parênquima hepático/campo analisado com aumento de 10 vezes.

A avaliação de necrose tecidual baseou-se em duas categorias: 0 - ausente e + - presente.

3.11 COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP), sob o título “Dieta Cetogênica e epilepsia: uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios” (Proc CEUA 1696/2021) (**Anexo 1**).

3.12 ASPECTOS FINANCEIROS

Este estudo está inserido no estudo principal intitulado “Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios” aprovado pela Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) como Auxílio à Pesquisa Individual (Proc 2020/03529-6), com vigência de 01/02/2021 a 31/08/2023 (**Anexo 2**).

Além disso, o projeto também conta com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (nº do processo 88887.609440/2021-00), vigência de 01/03/2021 a 31/08/2023.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados sob a forma de média e desvio padrão. Além disso, foi realizada a imputação de dados faltantes, decorrente do óbito de 2 animais ao longo do experimento, a partir do método *Expectation-maximization (EM)*. Utilizou-se o teste de *Shapiro-Wilk* para analisar a normalidade das amostras. Para as variáveis com distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico *ANOVA* para medidas independentes, com *post hoc* de *Tukey*. Para as variáveis não paramétricas utilizou-se o teste *Kruskal-Wallis*, com *post hoc* de *Dunnnett*.

Para as variáveis de medidas repetidas foi utilizado o teste paramétrico *ANOVA* para medidas repetidas, com *post hoc* de *Bonferroni*. Para as variáveis não paramétricas utilizou-se o teste de *Friedman*.

Para a análise de variáveis qualitativas, utilizou-se o teste Qui-quadrado *exato de Fisher*. Foi utilizado o programa *Statistic Package for the Social Science® (SPSS)* versão 23 para obtenção dos testes estatísticos. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foram de $p \leq 0,05$. Para a realização de gráficos e figuras foi utilizado o programa *PRISMA* versão 9.5.1.

5. RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS DIETAS HIPERLIPÍDICAS

A ração hiperlipídica administrada ao grupo DH foi caracterizada como rica em gorduras animais e, conseqüentemente, em AGS. A fim de promover melhor adaptação a esse padrão de dieta, a DH foi introduzida de modo progressivo em termos de conteúdo de gorduras em relação aos carboidratos e proteínas, ou seja, a progressão ofertada seguiu as seguintes proporções: 1:1, 2:1 e 4:1, isto é, 1, 2 ou 4 partes de energia sob a forma de AGS para 1 parte formada pela soma de proteínas e carboidratos. A **Tabela 2** descreve a composição das rações hiperlipídicas produzidas, segundo proporção de gorduras, proteínas e carboidratos.

Tabela 2. Descrição da composição nutricional teórica das dietas hiperlipídicas produzidas e administradas aos animais, conforme proporções 1:1, 2:1 e 4:1.

| NUTRIENTES (%) | DH 1:1 | DH 2:1 | DH 4:1 |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Proteínas</i> | 11,00 | 8,60 | 7,10 |
| <i>Carboidratos</i> | 19,00 | 8,10 | 1,70 |
| <i>Gorduras totais</i> | 70,00 | 83,26 | 91,20 |
| <i>Gorduras saturadas</i> | 50,26 | 50,27 | 50,60 |
| <i>Gorduras monoinsaturadas</i> | 28,05 | 27,88 | 27,50 |
| <i>Gorduras poli-insaturadas</i> | 21,69 | 21,86 | 21,90 |
| <i>Relação W6:W3</i> | 10,69 | 10,67 | 10,75 |
| <i>Mix minerais</i> | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| <i>Mix vitaminas</i> | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| <i>Celulose</i> | 4,00 | 4,00 | 4,00 |
| <i>L-cistina</i> | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| <i>Colina</i> | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| <i>Tert-butil-hidroquinona (BHA)</i> | 0,0014 | 0,0014 | 0,0014 |
| <i>Fosfato de potássio</i> | 0,41 | 0,41 | 0,41 |
| <i>Calorias (100 g)</i> | 559,19 | 625,11 | 673,30 |

Softwares utilizados para cálculo das dietas hiperlipídicas: Dietbox® (2023) e The Food Processor® (ESHA, 2023).

5.2 CONSUMO ALIMENTAR E PERFIL ANTROPOMÉTRICO

O consumo de ração, assim como o CEA mostraram diferenças significativas em vários momentos ao longo da intervenção (**Figura 9**). Em relação ao consumo de ração no momento T2, verificou-se que o grupo DF apresentou ingestão significativamente menor que o grupo DH (DF = 20,0±3,9 g e DH = 21,7±3,4 g; p=0,003), enquanto o consumo do grupo DC foi maior que o observado no grupo DH (DC = 32,0±4,0 g e DH = 21,7±3,4 g; p=0,0027). Nos momentos T3 e T4, os grupos DH e DF mantiveram perfis semelhantes ao observado no T2 (p=0,0001; para ambos). Em T5, o grupo DC apresentou maior ingestão de ração tanto quando comparado ao grupo DF (p=0,003) quanto ao grupo DH (p=0,028).

Quanto ao CEA/gramas, no momento T2, observamos que o grupo DC apresentou maior diferença significativa comparada aos grupos DH (DH = 0,069±0,008 e DC = 0,098±0,008; p<0,001) e DF (DF = 0,067±0,009 g e DC = 0,098±0,008 g; p=0,001). Em T3, o grupo DC apresentou diferença significativa maior comparada aos grupos DH (DH = 0,066±0,011 g e DC = 0,095±0,017 g; p=0,004) e DF (DF = 0,051±0,007 g e DC = 0,095±0,017 g; p<0,001). Já em T5, tal variável foi maior no grupo DC comparado aos grupos DF e DH (p<0,001 em ambos).

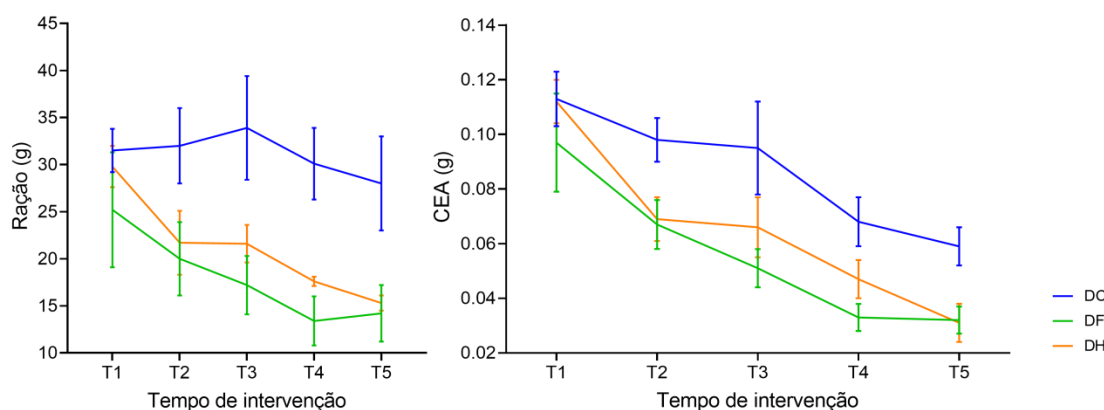


Figura 9. Avaliação de consumo de ração (gramas) e do CEA/gramas. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Quando comparamos a variação do consumo de ração entre os momentos T5 e T0, não foi observado diferença entre os grupos (**Figura 10**).

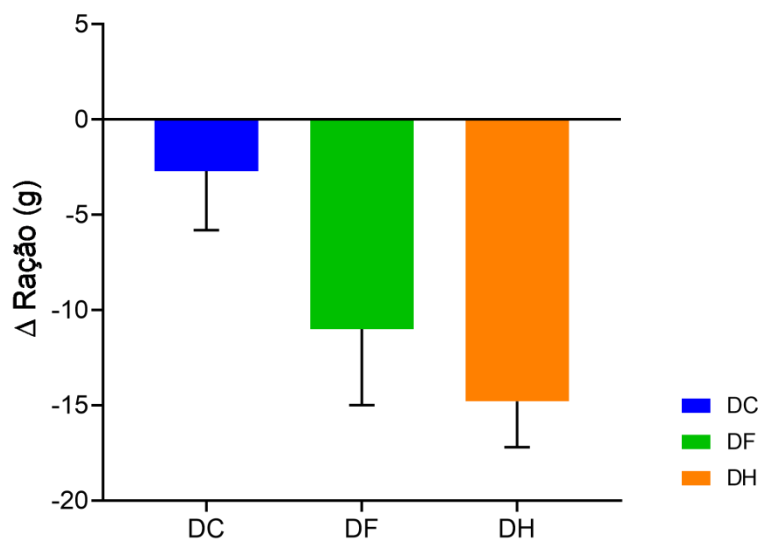


Figura 10. Delta de consumo de ração comparando T5 em relação ao T0. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Ademais, foi possível analisar a quantidade calórica do consumo apenas de ração dos animais, assim como o CEA ajustado pelas calorias (**Figura 11**). Em relação ao consumo de ração, em calorias, verificamos que em T1 houve diferença significativa entre o grupo DF e o grupo DH (DF = $74,2 \pm 17,9$ kcal e DH = $166,8 \pm 12,3$ kcal; $p=0,001$). No momento T2 observamos que o grupo DC apresentou diferença em relação aos grupos DF (DC = $94,4 \pm 11,9$ kcal e DF = $59,0 \pm 11,5$ kcal; $p=0,003$) e DH (DC = $94,4 \pm 11,9$ kcal e DH = $135,8 \pm 21,0$ kcal; $p=0,001$), assim como quando comparamos os grupos DF e DH (DF = $59,0 \pm 11,5$ kcal e DH = $135,8 \pm 21,0$ kcal; $p<0,001$). No momento T3, o grupo DC apresentou diferença em relação aos grupos DF (DC = $100,1 \pm 16,3$ kcal e DF = $50,6 \pm 9,2$ kcal; $p<0,001$) e DH (DC = $100,1 \pm 16,3$ kcal e DH = $145,5 \pm 13,6$ kcal; $p<0,001$), assim como quando comparamos os grupos DF e DH (DF = $50,6 \pm 9,2$ kcal e DH = $145,5 \pm 13,6$ kcal; $p<0,001$). O grupo DF apresentou diferença em relação ao grupo DH, tanto no momento T4 (DF = $94,4 \pm 8,6$ kcal e DH = $118,6 \pm 3,5$ kcal; $p<0,001$) quanto em T5 (DF = $168,8 \pm 15,7$ kcal e DH = $100,1 \pm 6,2$ kcal; $p=0,001$).

Quanto ao CEA/calorias, em T1 observamos que houve diferença significativa entre o grupo DF e o grupo DH (DF = $0,259 \pm 0,054$ kcal e DH = $0,626 \pm 0,046$ kcal; $p=0,002$). No momento T2 notamos que o grupo DC apresentou diferença

significativas em relação aos grupos DF (DC = $0,290 \pm 0,024$ kcal e DF = $0,197 \pm 0,025$ kcal; $p=0,017$) e DH (DC = $0,290 \pm 0,024$ kcal e DH = $0,429 \pm 0,051$ kcal; $p<0,001$), assim como diferença significativa quando comparamos os grupos DF e DH (DF = $0,197 \pm 0,025$ kcal e DH = $0,429 \pm 0,051,0$ kcal; $p=0,002$). Dessa mesma forma, também foi possível notarmos no momento T3 que o grupo DC apresentou diferença significativa em relação aos grupos DF (DC = $0,279 \pm 0,051$ kcal e DF = $0,149 \pm 0,021$ kcal; $p=0,002$) e DH (DC = $0,279 \pm 0,051$ kcal e DH = $0,447 \pm 0,073$ kcal; $p<0,001$), assim como quando comparamos os grupos DF e DH (DF = $0,149 \pm 0,021$ kcal e DH = $0,447 \pm 0,073$ kcal; $p=0,013$). O grupo DF apresentou diferença em relação ao grupo DH, tanto no momento T4 (DF = $0,236 \pm 0,015$ kcal e DH = $0,315 \pm 0,048$ kcal; $p<0,001$) quanto em T5 (DF = $0,393 \pm 0,076$ kcal e DH = $0,194 \pm 0,028$ kcal; $p<0,001$).

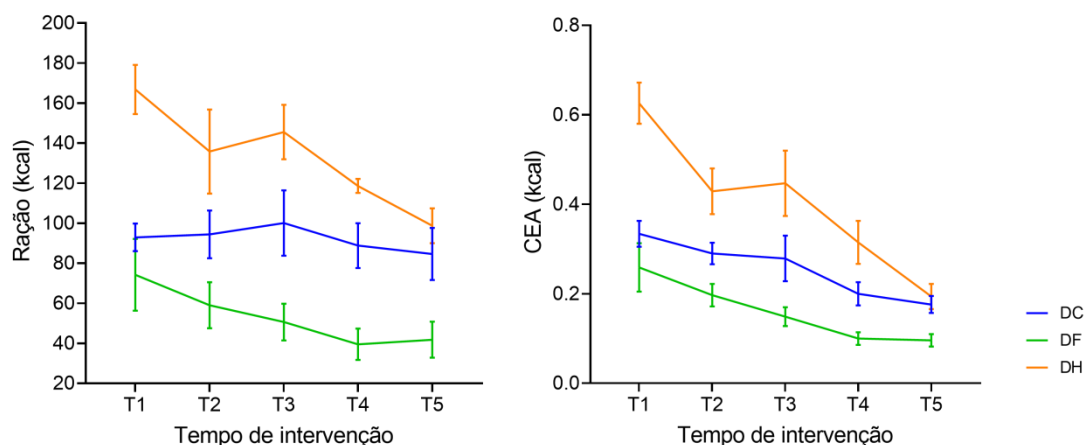


Figura 11. Calorias consumidas pelas rações e CEA/calorias. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

A variação no consumo de água entre grupos foi significativa ao longo da intervenção (**Figura 12**). Em T2, notamos que houve diferença significativa entre os grupos DF e DH (DF = $63,9 \pm 2,4$ mL e DH = $28,8 \pm 4,2$ mL; $p<0,001$). No momento T3, houve diferença significativa entre os grupos DC e DH (DC = $43,5 \pm 10,9$ mL e DH = $27,9 \pm 1,7$ mL; $p=0,002$) e também foi maior ao compararmos os grupos DF e DH (DF = $43,6 \pm 1,5$ mL e DH = $27,9 \pm 1,7$ mL; $p=0,002$). No momento T4, o grupo DC apresentou maior consumo de água em relação à DH (DC = $55,9 \pm 12,5$ mL e DH = $26,9 \pm 4,1$ mL; $p<0,001$), enquanto o grupo à DF teve maior consumo de água em relação à DH (DF =

45,8±2,2 mL e DH = 26,9±4,1 mL; p=0,002). Em T5, observamos perfil semelhante, isto é, o grupo DC apresentou maior ingestão de água em relação à DH (DC = 66,2±14,3 mL e DH = 60,8±4,0 mL; p<0,001), enquanto o grupo DF apresentou maior consumo de água relação à DH (DF = 105,8±14,2 mL e DH = 60,8±4,0 mL; p=0,002). A comparação do delta do consumo de água (T5 - T0) entre os grupos foi significativa, onde observamos que o grupo DF apresentou maior ingestão de água que o grupo DC (DF = 67,8±13,7 mL e DC = 17,8±10,1 mL; p=0,006), assim como em relação ao grupo DH (DF = 67,8±13,7 mL e DH = 20,6±5,1 mL; p=0,017).

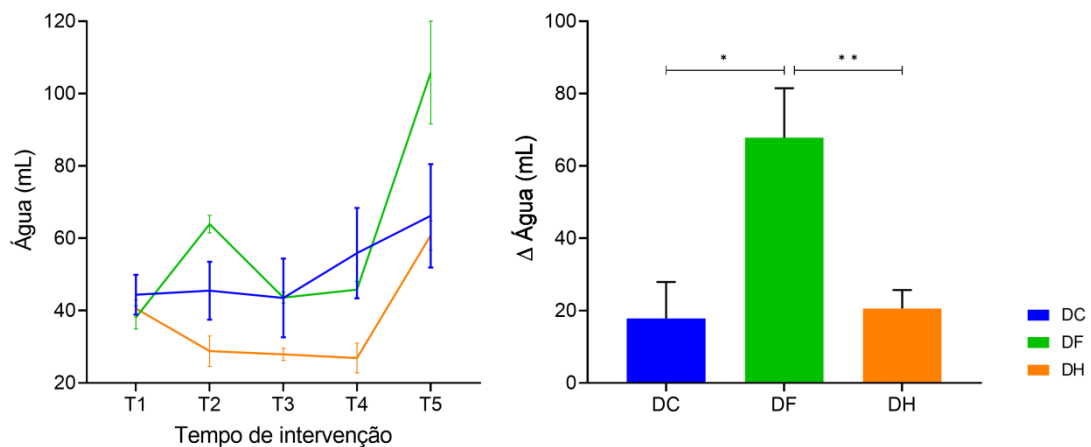


Figura 12. Avaliação de consumo de água (mL) ao longo do experimento e do delta de consumo de água comparando T5 em relação ao T0. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Como foi descrito acima, o grupo DF apresentou um consumo de água maior comparado aos demais grupos ao longo dos 100 dias de experimento (**Figura 13**).

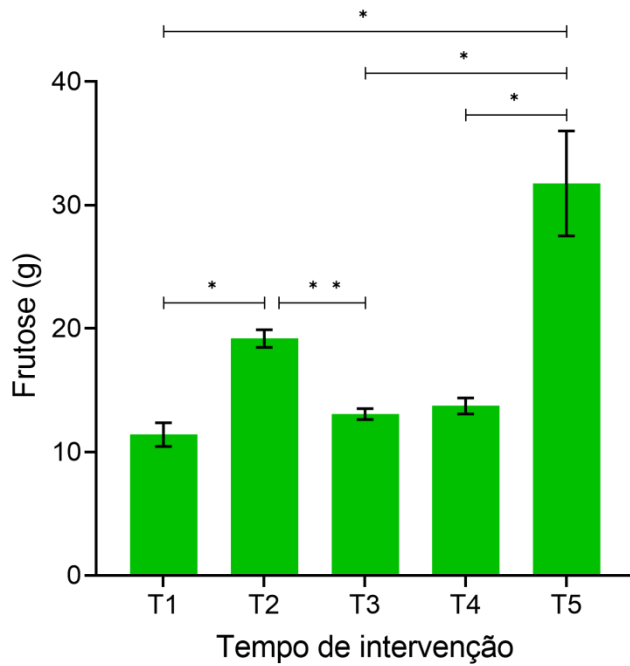


Figura 13. Avaliação de consumo de frutose, em gramas, entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Teste ANOVA, com post hoc de Bonferroni para variáveis paramétrica e teste de Friedman para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$. *, $p < 0,001$ e **, $p \leq 0,005$.

Na **Figura 14** podemos observar o consumo, em calorias, ao longo do experimento, tanto de ração, quanto de frutose diluída em água no grupo DF.

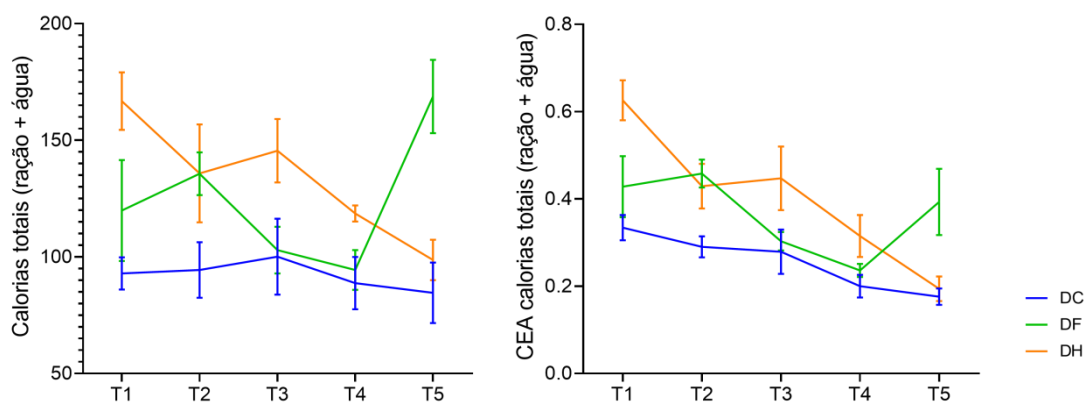


Figura 14. Avaliação de ingestão de calorias totais (ração + água, contendo frutose diluída) e do CEA/calorias, entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) ao longo de 100 dias de intervenção. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta

hiperlipídica. Teste *ANOVA*, com *post hoc* de *Bonferroni* para variáveis paramétrica e teste de *Friedman* para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Nessa mesma perspectiva, podemos observar na **Figura 15**, que os animais que pertenciam ao grupo DF tiveram maior variação de delta calorias quando comparados aos grupos DC (DF = $48,9 \pm 15,6$ kcal e DC = -14 ± 19 kcal; $p=0,002$) e DH (DH = $-82,1 \pm 36,2$ kcal e DC = -14 ± 19 kcal; $p<0,001$). Ademais, quando os grupos DC e DH foram comparados, observamos que o grupo DH teve um consumo calórico significativamente inferior ao grupo DC (DC = -14 ± 19 kcal e DH = $-82,1 \pm 36,2$ kcal; $p=0,001$).

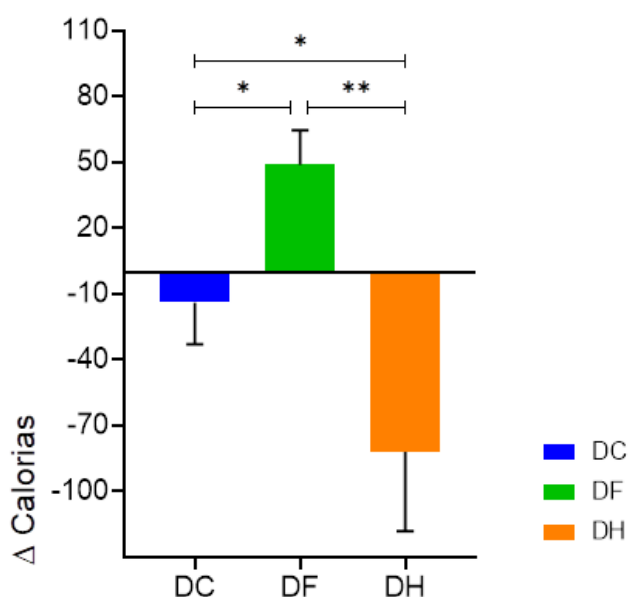


Figura 15. Delta de calorias consumidas comparando T5 em relação ao T0. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes *ANOVA* com *post hoc* de *Tukey* para variáveis paramétricas ou *Mann-Whitney* com *post hoc* de *Dunnet* para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Conforme podemos observar na **Figura 16**, os animais dos 3 grupos tiveram ganho de peso e crescimento significativo ao longo dos 100 dias de experimento ($p \leq 0,05$; para todos grupos). Quando comparamos a variação desses parâmetros ao longo do tempo, observamos que os grupos apresentaram perfis semelhantes. Entretanto, quando a variação do comprimento foi comparada entre os grupos, verificamos que o grupo DH apresentou diferenças significativas entre os grupos DC (DH = $25,4 \pm 0,6$ cm e DC = $24,4 \pm 0,6$ cm; $p=0,019$) e DF (DH = $25,4 \pm 0,6$ cm e DF = $23,6 \pm 0,4$ cm; $p<0,001$) ao término da intervenção (T5).

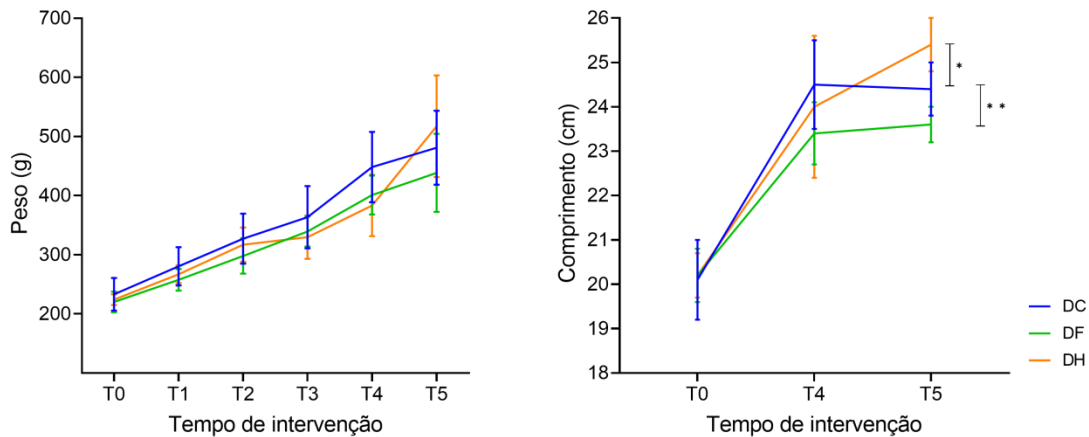


Figura 16. Avaliação de peso e de comprimento ao longo dos 100 dias de intervenção. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas (*, $p=0,019$ e **, $p<0,001$).

A **Figura 17** confirma as diferenças em relação ao comprimento descritas acima, onde há a comparação dos deltas (T5-T0) entre os grupos, o grupo DH apresentou diferenças significativas quando comparado com os grupos DC (DH = $5,1 \text{ cm} \pm 0,4$ e DC = $4,1 \pm 0,6 \text{ cm}$; $p=0,008$) e DF (DH = $5,1 \pm 0,4 \text{ cm}$ e DF = $3,4 \pm 0,5 \text{ cm}$; $p<0,001$).

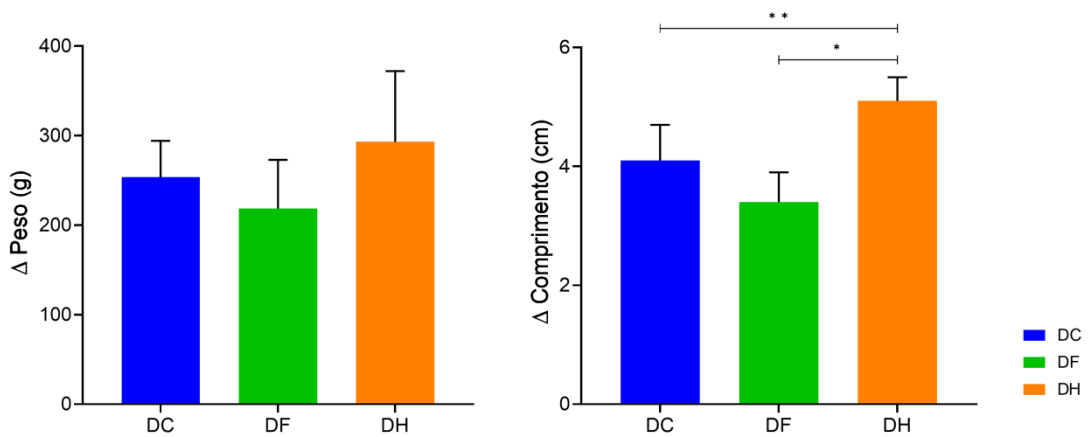


Figura 17. Deltas de peso e de comprimento comparando T5 em relação ao T0. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas (*, $p<0,001$ e **, $p=0,008$).

5.3 AVALIAÇÃO CETOSE E GLICOSE PLASMÁTICA

A glicose sanguínea apresentou perfil semelhante entre os grupos do estudo. Entretanto, quando analisamos a cetose plasmática observamos que o grupo DH apresentou aumento significativo em relação aos grupos DF (DH = 1,00 mmol/L \pm 0,19 e DF = 0,40 \pm 0,14 mmol/L; p=0,010) e DC (DH = 1,00 \pm 0,19 mmol/L e DC = 0,46 \pm 0,11 mmol/L p=0,044), conforme demonstrado na **Figura 18**.

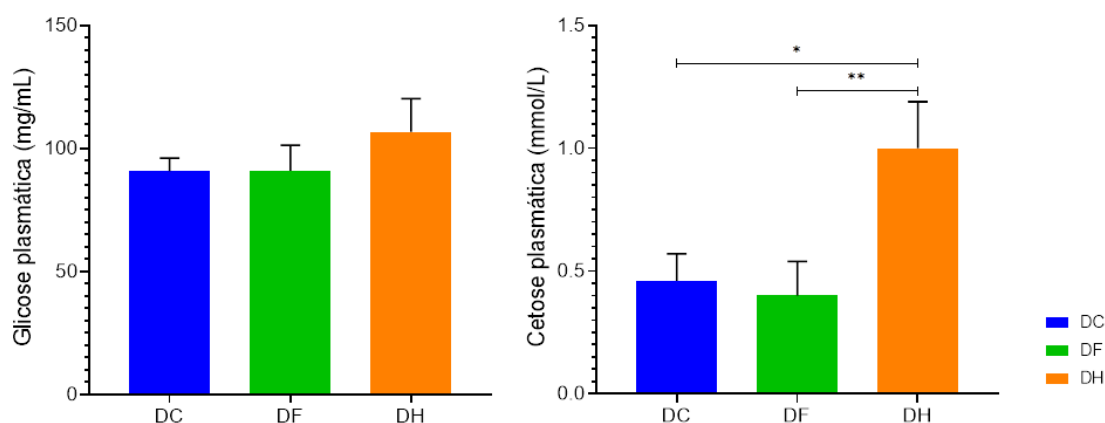


Figura 18. Avaliação de glicose e cetose plasmática no momento final (T5) do experimento. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.4 PERFIL BIOQUÍMICO PLASMÁTICO

De acordo com os parâmetros bioquímicos plasmáticos avaliados (**Tabela 3**), o grupo DF apresentou menores concentrações das enzimas hepáticas AST (DF = 78,8 \pm 16,6 U/L e DH = 116,6 \pm 23,9 U/L; p=0,009), ALT (DF = 13,2 \pm 2,6 U/L e DH = 19,3 \pm 3,3 U/L; p=0,016) e FA (DF = 0,7 \pm 0,6 U/L e DH = 3,8 \pm 1,1 U/L; p=0,017) quando comparado ao grupo DH. Além disso, o grupo DC teve maior concentração de FA quando comparado ao grupo DF (p=0,002). Os demais parâmetros plasmáticos apresentaram perfis semelhantes entre os grupos.

Tabela 3. Perfil bioquímico plasmático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção.

| Variáveis | DC | DF | DH |
|-----------------|--------------|-------------|----------------|
| | Média (DP) | Média (DP) | Média (DP) |
| AST (U/L) | 101,0 (14,6) | 78,8 (16,6) | 116,6 (23,9)** |
| ALT (U/L) | 16,8 (4,0) | 13,2 (2,6) | 19,3 (3,3)** |
| GGT (U/L) | 5,1 (4,7) | 13,3 (22,8) | 13,5 (13,9) |
| FA (U/L) | 11,8 (15,6) | 0,7 (0,6)* | 3,8 (1,1)** |
| Glicose (mg/dL) | 45,9 (8,2) | 40,5 (19,2) | 41,1 (13,1) |
| Frutose (mg/dL) | 29,6 (12,8) | 27,2 (13,5) | 39,7 (12,1) |

DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica; *DC versus DF e DC versus DF; **DF versus DH; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; FA, fosfatase alcalina. Resultados expressos em média e desvio padrão (DP). Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.5 AVALIAÇÃO DO TECIDO HEPÁTICO

O grupo DF apresentou um peso médio relativo do tecido hepático superior ao grupo DH (DF = $2,7 \pm 0,3$ g/g de peso corporal e DH = $2,3 \pm 0,1$ g/g de peso corporal; $p=0,005$) (Figura 19).

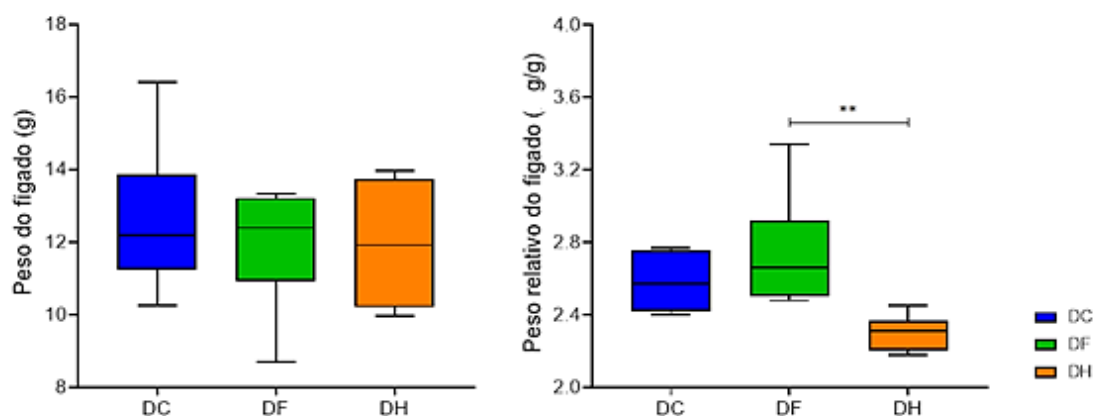


Figura 19. Peso bruto e relativo após 100 dias de experimento. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.6 PERFIL BIOQUÍMICO DO TECIDO HEPÁTICO

Em relação ao perfil bioquímico do tecido hepático houve resultados significativos para todas as análises, com exceção da concentração de proteínas totais (**Tabela 4**). O colesterol total bruto e ajustado pela concentração de proteínas totais do fígado foi maior nos animais do grupo DH, quando comparado aos grupos DC ($p=0,006$ e $p=0,009$, respectivamente) e DF ($p=0,010$ e $0,012$, respectivamente).

A concentração de triglicerídeos absoluta e ajustada pela quantidade de concentração de proteínas do fígado também apresentou um aumento no grupo DH quando comparado aos grupos DC ($p=0,003$ e $0,007$, respectivamente) e DF ($p=0,033$ e $0,015$, respectivamente).

Além disso, a concentração de AGNE foi significativamente superior no grupo DH, quando comparado ao grupo DF, tanto na sua forma absoluta ($p=0,002$), quanto na forma ajustada pela concentração de proteínas do fígado ($p=0,001$).

A avaliação da peroxidação lipídica por meio da detecção de TBARS no tecido hepático mostrou que o grupo DC apresentou concentrações brutas e ajustadas superiores aos grupos DF ($p=0,002$ e $<0,001$, respectivamente) e DH ($p<0,001$, para ambos os grupos).

Tabela 4. Perfil bioquímico do tecido hepático dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção.

| Variáveis | DC | DF | DH |
|--|---------------|-----------------|-------------------|
| | Média (DP) | Média | Média |
| Proteínas totais(mg/mL) | 27,4 (1,0) | 29,1 (2,2) | 28,2 (1,3) |
| Colesterol Total (mg/dL) | 94,2 (6,2) | 97,7 (14,6) | 167,8 (28,1)*, ** |
| Colesterol total (mg/mg de proteínas totais) | 34,4 (2,6) | 33,6 (4,5) | 59,6 (8,3) *, ** |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 196,7 (21,6) | 208,7 (12,2) | 387,4 (45,2)*, ** |
| Triglicerídeos (mg/mg de proteínas totais) | 72,2 (8,7) | 72,2 | 138,3 (14,6)*, ** |
| AGNE (mmol/L) | 2,7 (0,4) | 2,4 (0,3) | 6,0 (1,0)** |
| AGNE (mg/mg de proteínas totais) | 0,09 (0,01) | 0,10 (0,01) | 0,20 (0,03)** |
| TBARS (nM/dL) | 1484,9 (85,7) | 1235,5 (103,7)* | 1143,4 (122,0)* |
| TBARS (mg/mg de proteínas totais) | 54,3 (3,7) | 42,6* | 40,7 (4,7)* |
| FGF21 (pg/mL) | 0,421 (0,012) | 0,425 (0,01) | 0,431 (0,033) |
| PNPLA3 (ng/mL) | 2,73 (0,06) | 2,80 (0,04) | 2,26 (0,20)** |
| TM6SF2 (pg/mL) | 261,9 (25,3) | 274,9 (39,6) | 282,6 (45,2) |

DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica; *DC *versus* DF e DC *versus* DH; **DF *versus* DH; NEFA, ácidos graxos não esterificados; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; FGF21, fator de fibroblasto 21; PNPLA3, fosfolipase 3 associada à patatina; TM6SF2, membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6. Resultados expressos em média e desvio padrão (DP). Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.7 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO TECIDO HEPÁTICO

Ao analisarmos a incorporação dos ácidos graxos às membranas celulares do tecido hepático após 100 dias de intervenção foi possível observar diferenças significativas induzidas pelos diferentes tipos de dietas (**Tabela 5**).

Em relação aos AGS, os ácidos butírico, esteárico, caprótico, behênico e lignocérico apresentaram valores de incorporação no tecido hepático superiores nos animais do grupo DF, quando comparado ao grupo DH ($p=0,001$, $p=0,001$, $p<0,001$, $p=0,001$ e $p=0,003$, respectivamente). Além disso, o ácido butírico e o ácido esteárico também foram maiores no grupo DH do que no grupo DC ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente). Já os animais do grupo DH teve menor incorporação dos ácidos caprótico, behênico e heptadecanóico quando comparado ao grupo DC ($p=0,005$, $p=0,005$ e $p=0,017$, respectivamente).

Os animais do grupo DH, quando comparados ao grupo DF, apresentaram aumento dos ácidos graxos láurico ($p=0,026$), mirístico ($p=0,048$), pentadecanóico ($p<0,001$) e oleico ($p<0,001$). Ademais, o grupo DH apresentou maior incorporação desses mesmos ácidos, exceto o láurico, quando comparado ao grupo DC (ácido mirístico, $p=0,004$; ácido pentadecanóico, $p<0,001$; e ácido oleico, $p<0,001$).

Dentre os MUFA o ácido cis-11-eicosanóico apresentou variação significativa após 100 dias de intervenção, com valor superior no grupo DH quando comparado ao grupo DC e DF ($p=0,010$ e $0,014$, respectivamente).

Os animais do grupo DF teve menor percentual de ácido gama-linolênico quando comparado ao grupo DC. Além disso, o grupo DH apresentou menores quantidades de ácidos graxos cis-8,11,18-eicosatrienóico ($p=0,019$), araquidônico ($p<0,001$) e DHA ($p<0,001$), quando comparados ao grupo DC. Os ácidos araquidônico e DHA também foram significativamente maiores nos grupos DF comparados ao DH ($p=0,002$ e $p=0,003$, respectivamente). Já o ácido gama-linolênico foi menor no grupo DF quando comparado ao grupo DH ($p=0,016$).

Os animais do grupo DH em comparação aos grupos DF e DC tiveram maiores incorporações de ácidos linolênico (ambos $p < 0,001$), assim como o ácido cis-11,14-eicosadienóico que foi maior no grupo DH, porém comparado apenas ao grupo DF ($p = 0,033$). Já o EPA foi menor no grupo DH quando comparado aos grupos DF e DC (ambos $p < 0,001$).

Tabela 5. Incorporação de ácidos graxos em membranas celulares dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção, expressos em %.

| Variáveis (%) | DC | DF | DH |
|--|----------------|----------------|---------------------|
| | Média (DP) | Média (DP) | Média (DP) |
| Ácido Butírico (C4:0) | 1,034 (0,261) | 0,958 (0,157) | 0,411 (0,212)*, ** |
| Ácido Capróico (C6:0) | 0,032 (0,009) | 0,040 (0,011) | 0,011 (0,008)*, ** |
| Ácido Caprílico (C8:0) | 0,011 (0,006) | 0,026 (0,020) | 0,007 (0,004) |
| Ácido Cáprico (C10:0) | 0,019 (0,005) | 0,032 (0,019) | 0,015 (0,004) |
| Ácido Undecanóico (C11:0) | 0,017 (0,008) | 0,017 (0,010) | 0,062 (0,134) |
| Ácido Láurico (C12:0) | 0,119 (0,076) | 0,166 (0,281) | 0,467 (0,122)** |
| Ácido Mirístico (C14:0) | 0,302 (0,156) | 0,366 (0,152) | 1,107 (0,272)*, ** |
| Ácido Miristoleico (C14:1) | 0,015 (0,011) | 0,053 (0,052) | 0,030 (0,006) |
| Ácido Pentadecanoico (C15:0) | 0,124 (0,013) | 0,115 (0,025) | 0,173 (0,021)*, ** |
| Ácido Cis-10-Pentadecanoico (C15:1) | 0,155 (0,347) | 2,288 (5,536) | 0,146 (0,351) |
| Ácido Palmítico (C16:0) | 21,497 (0,321) | 23,523 (3,955) | 19,490 (1,078)** |
| Ácido Palmitoleico (C16:1) | 0,244 (0,126) | 0,853 (0,180)* | 0,205 (0,191)** |
| Ácido Heptadecanoico (C17:0) | 0,898 (0,232) | 1,557 (2,383) | 0,347 (0,288)* |
| Ácido Cis-10-Heptadecanoico (C17:1) | 0,018 (0,009) | 0,038 (0,027) | 0,051 (0,010)* |
| Ácido Esteárico (C18:0) | 19,710 (3,044) | 18,926 (4,029) | 9,800 (3,458)*, ** |
| Ácido Oleico (C18:1 n9-cis) | 6,780 (3,108) | 8,345 (2,694) | 19,150 (4,001)*, ** |
| Ácido Elaídico (C18:1 n9-trans) | 1,687 (0,309) | 3,168 (0,819)* | 0,296 (0,696)*, ** |
| Ácido Linoleico (C18:2 n6-cis) | 15,461 (3,463) | 12,065 (2,992) | 30,275 (5,682)*, ** |
| Ácido Linolelaídico (C18:2 n6-trans) | 0,635 (0,994) | 0,038 (0,019) | 0,095 (0,139) |
| Ácido Gama-linolênico (C18:3 n6) | 0,747 (0,576) | 0,023 (0,008)* | 0,633 (0,128)** |
| Ácido Linolênico (C18:3 n3) | 0,381 (0,088) | 0,171 (0,056) | 0,569 (0,546) |
| Ácido Araquídico (C20:0) | 0,081 (0,044) | 0,252 (0,322) | 0,121 (0,061) |
| Ácido Cis-11-Eicosanóico (C20:1) | 0,062 (0,032) | 0,061 (0,017) | 0,231 (0,063)*, ** |
| Ácido Cis-11,14-Eicosadienóico (C20:2) | 0,158 (0,050) | 0,137 (0,168) | 0,314 (0,070)** |

| | | | |
|---|----------------|-----------------|---------------------|
| Ácido Cis-8,11,18 Eicosatrienóico (C20:3 n6) | 1,620 (0,449) | 2,202 (1,401) | 0,845 (0,353)** |
| Ácido Heneicosanóico (C21:0) | 0,052 (0,032) | 0,037 (0,038) | 0,128 (0,209) |
| Ácido Araquidônico (C20:4 n6) | 22,183 (3,101) | 18,788 (3,034) | 11,148 (3,433)*, ** |
| Ácido Cis-11,14,17 Eicosatrienóico (C20:3 n3) | 0,023 (0,008) | 0,043 (0,062) | 0,020 (0,005) |
| Ácido Eicosapentaenóico (EPA) (C20:5 n3) | 0,174 (0,064) | 0,126 (0,035) | 0,413 (0,106)*, ** |
| Ácido Behênico (C22:0) | 0,127 (0,023) | 0,141 (0,038) | 0,063 (0,027)*, ** |
| Ácido Erúico (C22:1 n9) | 0,047 (0,019) | 0,033 (0,014) | 0,029 (0,014) |
| Ácido Cis-13,16-Docosadienoico (C22:2) | 0,064 (0,044) | 0,333 (0,610) | 0,031 (0,055)** |
| Ácido Docosahexaenóico (DHA) (C22:6 n3) | 5,051 (0,622) | 4,530 (0,466) | 3,301 (0,509)*, ** |
| Ácido Lignocérico (C24:0) | 0,424 (0,069) | 0,719 (0,565) | 0,163 (0,136)** |
| Ácido Nervônico (C24:1) | 0,084 (0,016) | 0,154 (0,094) | 0,036 (0,029)** |
| Ômega 3 | 5,630 (0,664) | 4,865 (0,481) | 4,304 (0,622)** |
| Ômega 6 | 45,855 (1,512) | 37,783 (3,960)* | 46,611 (1,636)** |
| MUFA | 9,090 (3,518) | 14,986 (5,994) | 20,172 (2,989)* |
| PUFA | 46,497 (1,500) | 38,451 (3,510)* | 47,644 (1,708)** |
| AGS | 44,403 (3,064) | 46,840 (5,319) | 32,335 (4,527)*, ** |

DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica; *DC *versus* DF e DC *versus* DH; **DF *versus* DH; MUFA, ácidos graxos monoinsaturados: miristoleico, cis-10-pentadecanoico, cis-11-eicosanóico, palmitoleico, cis-10-heptadecanoico, oleico, elaídico, erúico, nervônico; PUFA, ácidos graxos polinsaturados: ácido Linolênico, ácido cis-11,14,17 eicosatrienóico, eicosapentaenóico, docosahexaenóico, linoleico, linolelaídico, gama-linolênico, ácido cis-11,14-eicosadienóico, ácido cis-8,11,18 eicosatrienóico, araquidônico, ácido cis-13,16-docosadienoico; AGS, ácidos graxos saturados: butírico, capríco, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, lignocérico, araquídico, behênico, undecanóico, tridecanoico, heneicosanoico, pentadecanoico, heptadecanoico, tricosanoico; Ômega 3: ácido linolênico, ácido cis-11,14,17 eicosatrienóico; eicosapentaenóico; docosahexaenóico; Ômega 6: linoleico, linolelaídico, gama-linolênico, ácido cis-11,14-eicosadienóico, ácido cis-8,11,18 eicosatrienóico, araquidônico, ácido cis-13,16-docosadienoico. Resultados expressos em média e desvio padrão (DP). Testes ANOVA com post *hoc* de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post *hoc* de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Os MUFA foram significativamente maiores no grupo DH, quando comparados ao grupo DC ($p=0,001$). Já os PUFA, no grupo DF, apresentaram conteúdo inferior comparado aos grupos DC e DH (ambos $p<0,001$). Porém, os ácidos graxos saturados totais foram menores no grupo DH quando comparado aos grupos DC ($p=0,001$) e DF ($p<0,001$) (**Figura 20**).

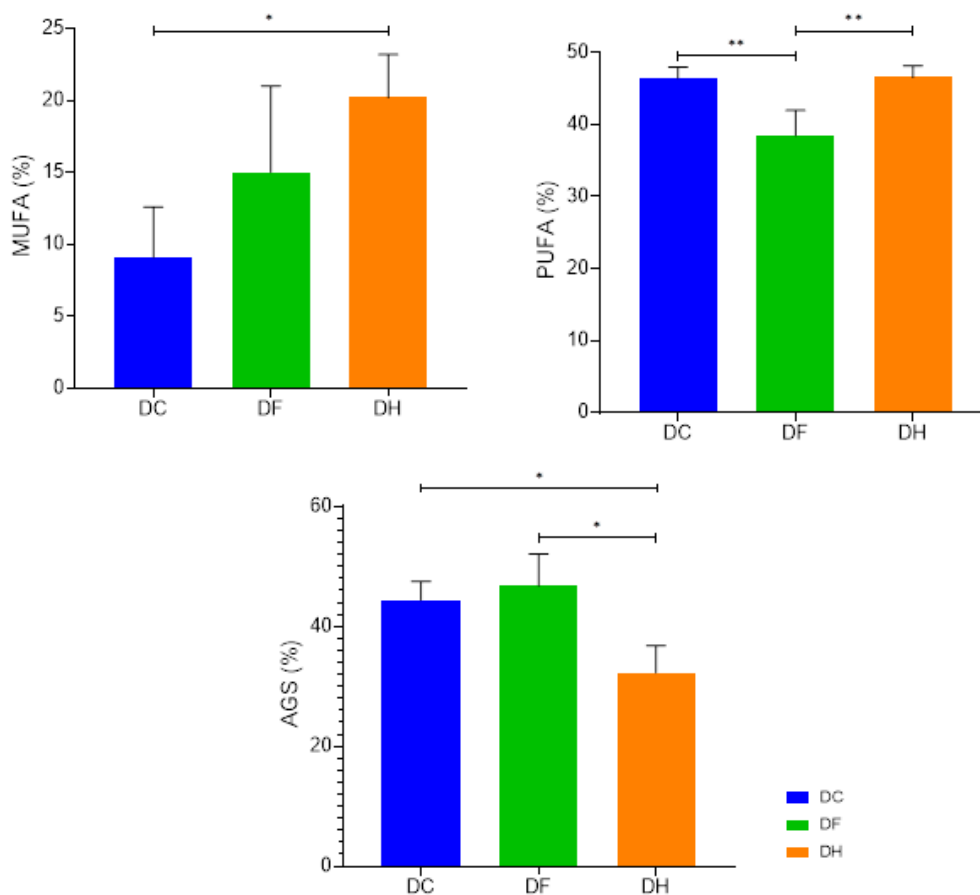


Figura 20. Concentração, em percentual, de PUFA, MUFA e AGS após 100 dias de experimento. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Conforme mostrado na **Figura 21**, o percentual total de ômega 3 foi menor no grupo DH comparado ao grupo DC ($p=0,004$). Já o perfil de ômega 6 foi menor no grupo DF tanto comparado ao grupo DH quanto ao grupo DC (ambos $p<0,001$).

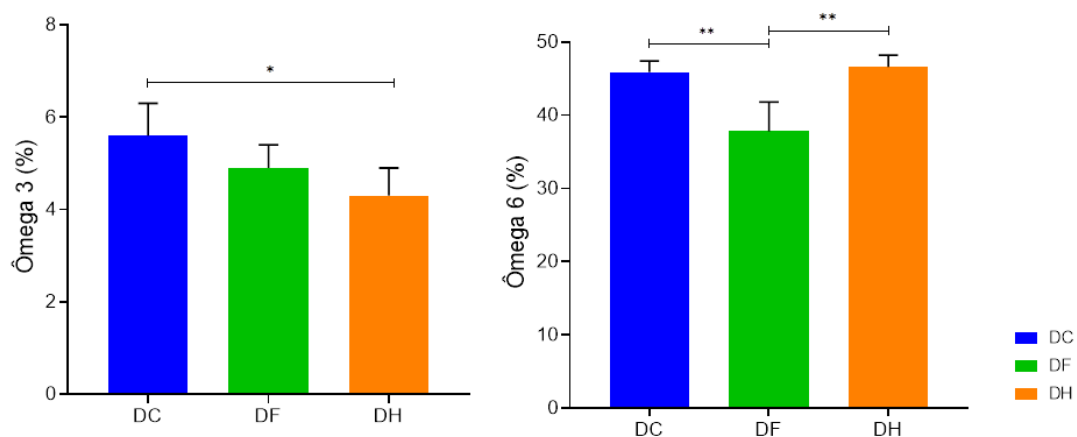


Figura 21. Concentração, em percentual, de ômega 3 e ômega 6 após 100 dias de experimento. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes *ANOVA* com *post hoc* de *Tukey* para variáveis paramétricas ou *Mann-Whitney* com *post hoc* de *Dunnet* para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.8 CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS

A concentração de citocinas no tecido hepático pode ser observada na **Figura 22**. O grupo DF apresentou concentrações maiores e significativas para todas as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), quando comparado aos grupos DC ($p=0,015$; $0,016$; $0,003$, respectivamente) e DH ($p<0,001$ para estas citocinas). A IL-10 também foi superior no grupo DF quando comparado aos grupos DC ($p=0,002$) e DH ($p<0,001$). A IL-6 no grupo DH foi significativamente menor quando comparada ao grupo DC ($p<0,001$), assim como a IL-10 no grupo DH foi significativamente menor quando comparada ao grupo DC ($p<0,001$).

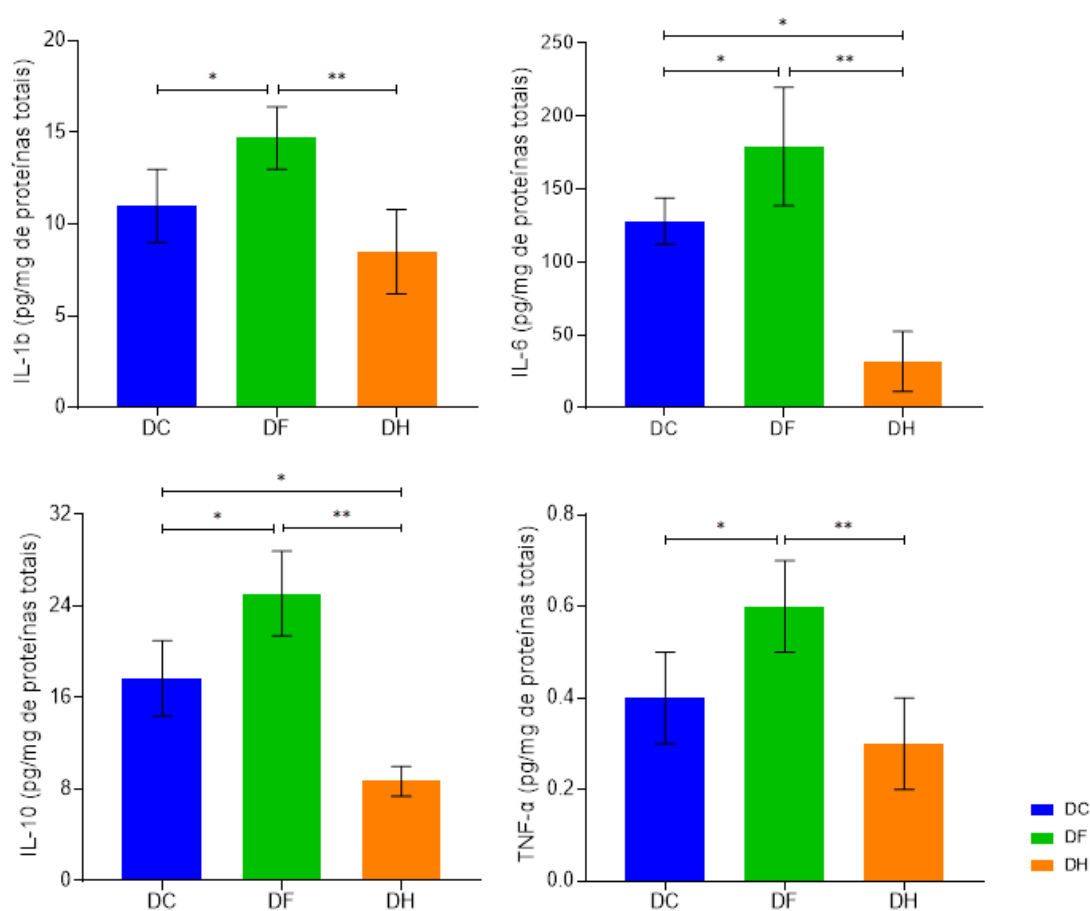


Figura 22. Concentração de citocinas pró e anti-inflamatória. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.9 ANÁLISES DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À ESTEATOSE HEPÁTICA

A PNPLA3 mostrou aumento significativo no grupo DF quando comparado ao grupo DH ($p=0,001$), embora tenha sido semelhante ao grupo DC ($p=0,306$). As proteínas FGF21 e TM6SF2 apresentaram perfis semelhantes entre os grupos (**Figura 23**).

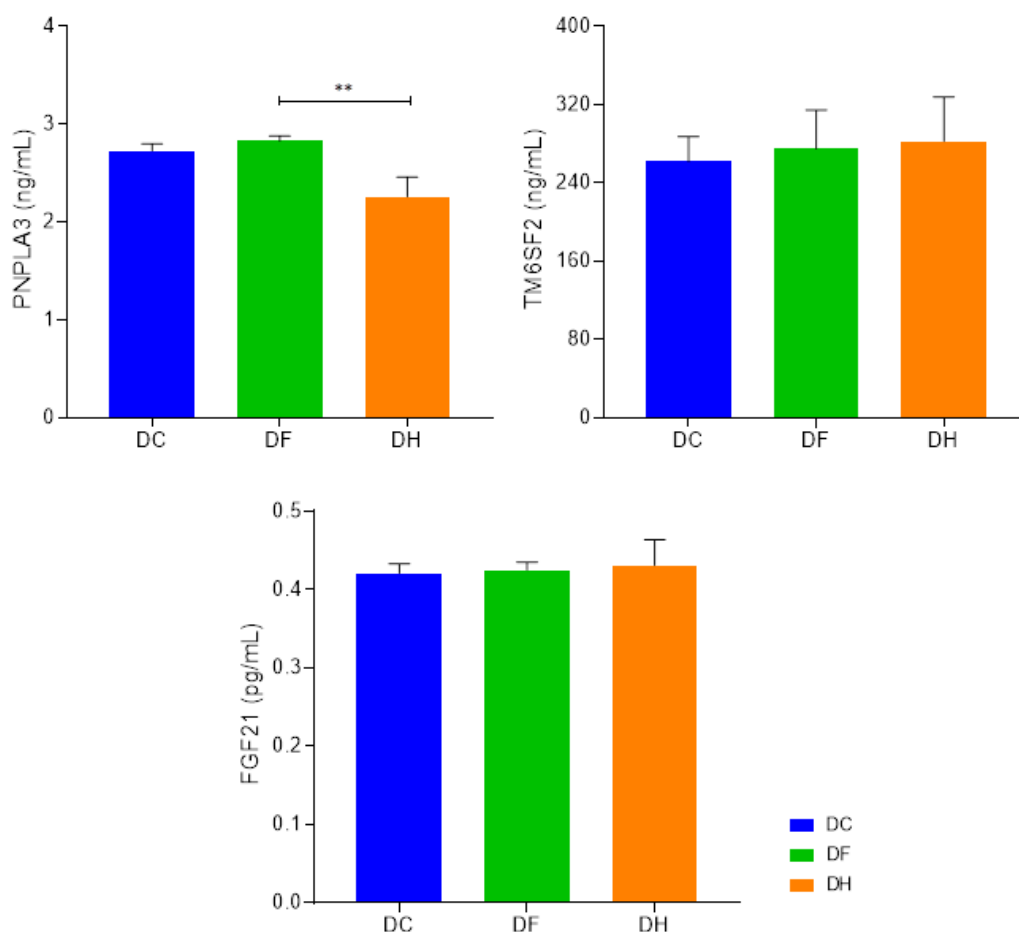


Figura 23. Concentração de fosfolipase 3 associada à patatina (PNPLA3), fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6 (TM6SF2) no tecido hepático entre os grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de experimento. PNPLA3, fosfolipase 3 associada à patatina; TM6SF2, membro 2 da superfamília da proteína transmembrana 6; FGF21, fator de crescimento de fibroblasto 21. Testes ANOVA com post hoc de Tukey para variáveis paramétricas ou Mann-Whitney com post hoc de Dunnet para variáveis não paramétricas. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.10 HISTOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO

A partir da análise histológica do tecido hepático, mostrado na **Tabela 7**, foi possível observar que houve significativa infiltração inflamatória no grupo DH, quando comparado com os grupos DC ($p=0,048$) e DF ($p=0,002$). Quando avaliamos a presença de infiltração de gordura no tecido hepático, foi possível identificar aumento significativo no grupo DH, quando comparado aos grupos DF ($p=0,015$) e DC ($p=0,048$). Nenhum dos grupos apresentou desenvolvimento de necrose tecidual ao longo do experimento.

Tabela 6. Análise histológica do fígado dos grupos Dieta Controle (DC), Dieta Frutose (DF) e Dieta Hiperlipídica (DH) após 100 dias de intervenção.

| Variáveis | DC | DF | DH |
|-------------------------|----------|----------|---------------|
| | n (%) | n (%) | n (%) |
| Infiltrado inflamatório | | | |
| <i>Não</i> | 4 (40,0) | 6 (60,0) | 0 |
| <i>Sim</i> | 1 (16,7) | 0 | 5 (83,3)*, ** |
| Infiltração de gordura | | | |
| <i>Não</i> | 4 (44,4) | 5 (55,6) | 0 |
| <i>Sim</i> | 1 (14,3) | 1 (14,3) | 5 (71,4)*, ** |

DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica; *DC *versus* DF e DC *versus* DH; **DF *versus* DH n, frequência; %, percentual; teste Exato de Fisher. Nível de significância de $p \leq 0,05$.

Na **Figura 24**, temos a fotomicrografia do tecido hepático aumentado 40x. Podemos observar a presença de gotículas de gorduras na imagem referente ao grupo DH, assim como de infiltrados inflamatórios. As imagens correspondentes aos grupos DC e DF são semelhantes entre si.

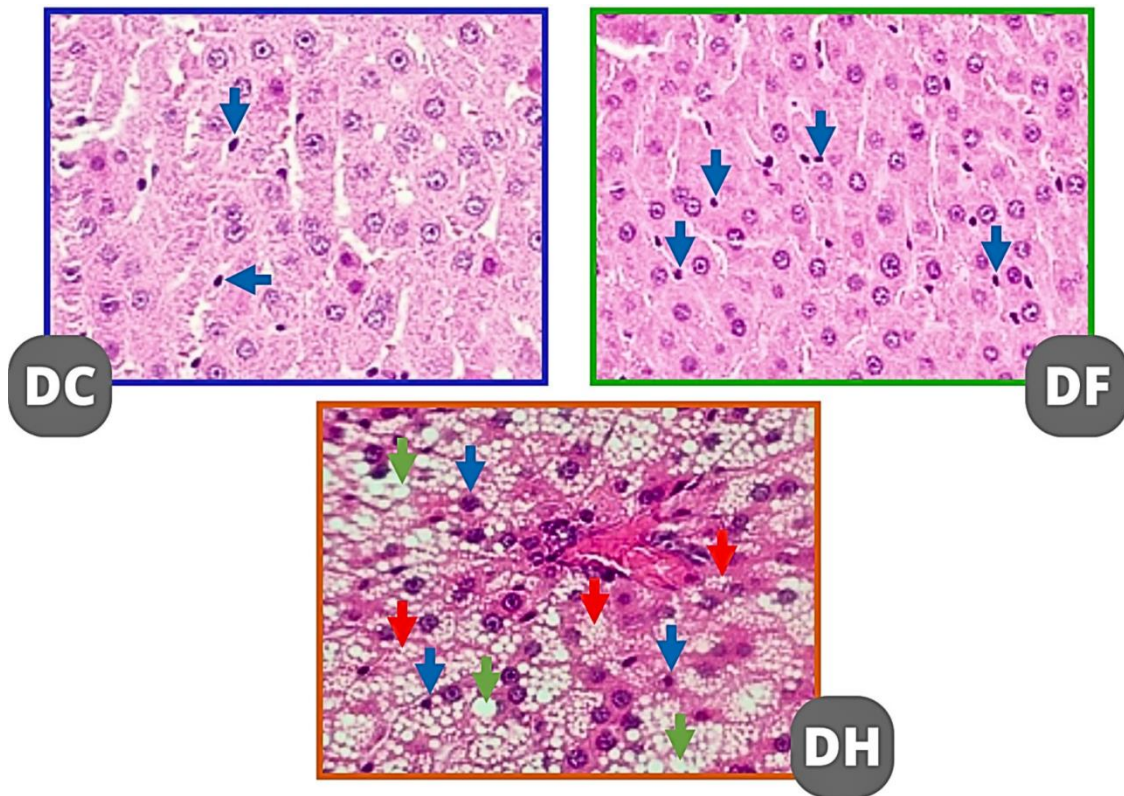


Figura 24. Fotomicrografia do tecido hepático aumentando 40x. DC, dieta controle; DF, dieta frutose; DH, dieta hiperlipídica. As setas azuis demonstram pequenos linfócitos maduros entremeados entre os lençóis de hepatócitos, indicando o infiltrado inflamatório crônico, leve (DC), moderado (DF) e moderado a acentuado (DH). As setas vermelhas indicam microgotículas de gordura (esteatose hepática microgoticular) e as setas verdes indicam as macrogotículas de gordura (esteatose hepática macrogoticular).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o consumo excessivo de frutose e lipídeos impactou negativamente e, por vias metabólicas distintas, o metabolismo lipídico, a inflamação e o desenvolvimento da esteatose hepática. Esses resultados podem ser parcialmente explicado pelas características intrínsecas do desenho experimental, onde foi administrada 30% de frutose à água (GF), assim como pelo perfil qualitativo de ácidos graxos da DH (90% das calorias totais), ambas consumidas *ad libitum*.

O consumo de frutose e, conseqüentemente, de calorias por meio da ingestão de água foi significativamente superior aos grupos DC e DH, embora esse grupo tenha apresentado redução no consumo de ração. Perfil semelhante foi descrito no estudo de Dos Santos et al. (2020), onde os camundongos alimentados com ração padrão e frutose administrada na água (10%) apresentaram ingestão hídrica 85% superior ao grupo controle. Alimentos altamente palatáveis, como a frutose, quando consumidos de forma crônica, pode ter como consequência neuroadaptações nas vias interligadas a recompensa da dopamina, impactando os mecanismos homeostáticos e hedônicos que controlam o comportamento alimentar (WISS, 2017).

Entretanto, os estudos de Yamazaki et al. (2018) e Dias et al. (2020), ambos baseados na administração de frutose na água (20% e 10%, respectivamente) e consumo *ad libitum* de água e ração, mostraram que o consumo calórico, ganho de peso e comprimento foram semelhantes entre os grupos após 160 e 60 dias de intervenção, respectivamente. Mais recentemente, Maya-Romero et al. (2022) descreveram uma maior ingestão de água e uma redução compensatória no consumo de ração dos animais que receberam frutose (11%) na água. Assim como também podemos observar no estudo de Milutinović et al. (2020), no qual o grupo que ingeriu água contendo 20% de frutose, durante 9 semanas, apresentou menor consumo de ração e maior ingestão calórica; perfil semelhante ao observado no presente estudo.

Além do impacto que a frutose na água exerceu no consumo calórico do grupo DF, devemos considerar a elevada densidade calórica da DH (6,73 kcal/g de ração), quando comparada às DC (2,95 kcal/g de ração) e DF (4,15 kcal/g de ração + água). Previamente, Garman (2021) relatou que os animais que consumiram rações hiperlipídicas apresentaram um maior consumo calórico. Em nosso estudo, a maior densidade calórica se associou diretamente à redução no consumo de ração, ou seja, -

0,92% (grupo DC), -3,73% (grupo DF) e -5,02% (grupo DH). Recentemente, Sandoval-Salazar (2023) observou que a ingestão alimentar dos animais que consumiram DH (40% de lipídeos) foi 30% menor que o grupo controle.

Embora em nosso trabalho os animais que consumiram as DH e DF tenham apresentado um consumo de ração reduzido ao longo do tempo e ingestão calórica maior no grupo DF, o ganho de peso foi semelhante entre os grupos. Apesar disso, a taxa de crescimento no grupo DH foi superior aos demais grupos. Esse perfil esteve associado ao menor consumo de proteínas no grupo DF, uma vez que 12,1% das calorias foram consumidas na forma de proteínas pelos animais desse grupo, enquanto o grupo DH consumiu 23% de proteínas. De acordo com a AIN93-G, o crescimento adequado de ratos depende do aporte calórico e proteico adequados (BARNARD, 2009; LIEN, 2001). No caso do grupo DH, a dieta administrada era hipercalórica e normoproteica, garantindo o crescimento adequado.

Após a realização de um levantamento bibliográfico, foi possível identificar que há basicamente duas estratégias experimentais utilizadas para analisar os efeitos negativos em relação ao consumo excessivo de frutose, isto é, frutose adicionada em água ou frutose utilizada ingrediente na produção da ração. No estudo de Mhd Omar et al. (2021), os animais foram alimentados com frutose (50%) adicionada na ração por 12 semanas. Os animais do grupo DF ingeriram maior quantidade calórica quando comparado ao grupo que ingeriu dieta rica em amido com adição de frutooligossacarídeos (FOS), porém não houve diferença significativa em relação ao peso corporal dos animais. Ademais, no estudo de Rai (2020), dentro os 4 grupos experimentais, 1 teve intervenção com ração contendo 65% de frutose, ao longo de 20 semanas. O ganho de peso entre os grupos foi semelhante. Anteriormente, o estudo de De Castro (2015), descreveu que o grupo frutose (63% - ração) e consumo *ad libitum*, não induziu diferenças significativas quanto ao ganho de peso corporal e comprimento ao longo dos 90 dias de experimento, quando comparado ao seu controle.

García-Berumen et al. (2019) avaliaram o impacto de 42 dias de intervenção com 25% de frutose administrada na água *ad libitum*. Essa estratégia promoveu, ao contrário do nosso estudo, um maior ganho de peso nos animais que receberam dieta com adição de frutose em água comparada ao grupo controle. No entanto, no estudo de Souza et al. (2022), todos os animais, quando filhotes, ingeriram dieta controle desde o desmame até atingirem a idade adulta, e depois um dos grupos, o grupo frutose,

consumiu frutose dos 120 aos 150 dias de idade. O grupo que recebeu água contendo 15% de frutose, também *ad libitum*, ao longo de 30 dias, apresentou maior ingestão de líquido e reduzida ingestão de ração, o que favoreceu ao consumo calórico semelhante entre os dois grupos. Além disso, a dieta com frutose não impactou no ganho de peso corporal dos animais. Em experimento realizado por Berenyiova (2021) ao longo de 8 semanas, embora os animais do grupo que ingeriram frutose à 10%, diluída em água, *ad libitum* tenham consumido maior quantidade de líquido, ingestão de ração foi menor, quando comparada ao grupo controle. Também não houve diferença no ganho de peso corporal dos animais.

O crescimento corporal adequado de animais em estudos experimentais é associado ao ganho de peso, a partir de padrões de referências (NEVES et al., 2013). O referencial de dieta padrão para ratos e camundongos, a AIN-93, apresenta uma composição centesimal diferente da DH do presente estudo, isto é, a dieta padrão contém cerca de 7,1% de lipídios, sendo a principal fonte de gordura o óleo de soja, 18,1% de proteínas e 59,3% de carboidratos (REEVES et al., 1993).

Nos estudos de Bielohuby et al. (2013; 2011), duas intervenções com diferença na proporção de macronutrientes foram propostas, a qual apresentou possíveis efeitos da inadequação de proteínas sobre a ingestão alimentar dos animais. O grupo que recebeu 19,1% de proteínas apresentou peso corporal similar quando comparado ao grupo controle, enquanto que aqueles que receberam DH, contendo 5,5% de proteínas na ração apresentaram um peso corporal inferior ao final do experimento. Além disso, Gianfranca et al. (2020) demonstraram em estudo, que ratos submetidos a uma dieta pobre em ácidos graxos essenciais apresentaram no final do experimento peso corporal 50% inferior ao grupo controle, sugerindo também um efeito negativo da deficiência desses ácidos graxos no crescimento. Contudo, ao analisarmos dois estudos experimentais de períodos mais longos, 40 (DHANDAPANI et al., 2019) e 22 semanas (ELLENBROEK et al., 2014) os animais apresentaram peso final superior e similar ao grupo controle, respectivamente.

No presente estudo podemos observar que independente da dieta consumida pelos animais, houve ganho de peso significativo ao longo do tempo. Dentre os 3 grupos, pode-se notar que, no momento final (T5), os animais do grupo DF tiveram ganho de peso corporal menor, sendo tal efeito observado também nos resultados de Mahmood et al. (2019) e Lozano et al. (2016). Em contrapartida, assim como nos estudos de Szabó et

al. (2021) e de Woodie & Blythe (2017), os animais do grupo DH tiveram ganho de peso mais acentuado. Além disso, houve maior crescimento nos animais que receberam DH. Tais resultados corroboram positivamente em relação ao desenvolvimento desses animais.

Em conjunto, nossos resultados e também aqueles descritos na literatura mostram que o consumo excessivo de frutose e lipídeos pode exercer impacto metabólico negativo e diferente à depender da quantidade e tipo de nutriente, via de administração e duração da intervenção.

O monitoramento da cetose urinária e plasmática tem sido um parâmetro universalmente aceito como medida de adesão à intervenção e estabilidade da resposta metabólica frente ao consumo regular de DH (DRABINSKA, 2022; HARVEY, 2018). A DH é capaz de aumentar a síntese de corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona), sendo o BHB, o biomarcador mais estável e monitorado na rotina clínica (DYNKA, 2022; GUPTA, 2017; PUCHALSKA, 2017). Conforme esperado, o grupo DH apresentou concentrações significativamente superiores de cetose quando comparado aos grupos DC e DF, embora todas as análises tenham sido feitas após jejum de 12 horas. A presença ou não de jejum na coleta de material biológico em estudos de intervenção com DH é um ponto importante a ser considerado para fins de comparação entre os estudos. Fisiologicamente, a cetose plasmática e cetonúria refletem a duração do jejum, independente do padrão dietético prévio. Em nosso estudo, optamos por manter todos os grupos sob jejum de 12h para normalizar não só a cetose, mas todos os demais biomarcadores analisados. O consumo duradouro de DH promove elevação do BHB, em detrimento da redução da glicose na fase aguda. Essa hipoglicemia relativa tende a ser normalizada com a ativação da neoglicogênese. Apesar dessa resposta fisiológica, em situações onde a metabolização dos corpos cetônicos é limitada, como por exemplo, na presença de deficiência carnitina palmitoil transferase (CPT), o BHB se acumulará ao nível sanguíneo, estimulando a redução no pH e, conseqüentemente, à cetoacidose (FUJIKURA, 2021; PAOLI, 2014). No presente estudo, o grupo DH não apresentou cetoacidose, nem diferença significativa na glicemia, quando comparado aos grupos DC e DF, possivelmente devido a estabilização da resposta metabólica após 100 dias de intervenção.

Outro aspecto importante observado no presente estudo relacionado ao metabolismo dos carboidratos se refere ao perfil semelhante de frutose plasmática

observada entre os três grupos após a intervenção. A frutose é absorvida por meio de um processo Na-dependente; fato que contrui para um processo mais lento de absorção, quando comparada à glicose (FUCHS, 2019; TAPPY, 2018; TAPPY & ROSSET, 2017). Apesar disso, sua biodisponibilidade plasmática é maior, pois há preferência metabólica quando comparada à glicose (LAUGHLIN, 2014). Nosso estudo não observou acúmulo de frutose no grupo DF, possivelmente porque esse grupo tinha uma menor oferta de glicose, tornando a frutose o nutriente mais disponível para manter a homeostase energética e também glicêmica.

No presente estudo, mesmo quando a frutose foi administrada a 30%, observamos que parte dessa frutose foi utilizada para a geração de energia, havendo somente um excesso parcial deste nutriente disponível para estimular as vias lipogênicas.

A literatura descreve amplamente o papel negativo do excesso de frutose, assim como de lipídeos, no metabolismo lipídico (JOHNSON, 2018; TASKINEN, 2019; ZHANG et al., 2016). Nossos resultados mostram que a nível hepático, a frutose não foi capaz promover aumento na concentração de CT, TG e AGNE. De modo contrário, no estudo de Shimada et al. (2023), em que o grupo de animais que consumiu ração contendo frutose (65%), em um período de 7 dias, apresentou maior concentração de TG ao nível hepático comparado ao grupo controle. De modo semelhante, no estudo de Pektas et al. (2017), o grupo que recebeu água contendo 10% de frutose, *ad libitum* durante 24 semanas apresentou maior concentração de TG hepático, quando comparado ao grupo controle.

De acordo com Ferramosca (2014), as DH são capazes de inibir a lipogênese hepática, porém promovem acúmulo de TG no fígado. Tal acúmulo pode ser consequência da alta captação de AG, a menor oxidação desses. Estudos mostram que a administração de frutose associada à DH promove elevação nas concentrações de TG hepático superior ao impacto isolado da frutose e lipídeos, conforme observado nos estudos de Lee (2015) e Zaki (2019). Nossos resultados mostraram que o grupo DH apresentou maiores concentrações de CT, TG e AGNE ao nível hepático. De acordo com Moore (2019) a DH estimula a síntese de AGNE e, conseqüente, seu acúmulo ao nível hepático, sob a forma de TG.

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que crianças e adolescentes sob tratamento dietoterápico com DH ricas em AGS e PUFA apresentaram elevação

significativa no CT e TG plasmático após 90 e 180 dias de intervenção (PRUDENCIO, 2017). Importante destacar que o consumo de DH rica em PUFA esteve associado a menor incidência de dislipidemias, confirmando o potencial modulador dos ácidos graxos PUFA no metabolismo lipídico (IZAR et al., 2021). A DH utilizada em nosso estudo foi pobre em PUFA, tendo apresentado uma razão AGS/PUFA de 0,73%.

A avaliação do perfil de AG ao nível hepático nos três grupos experimentais mostrou um perfil não correlacionado aos AG consumidos. Esse fato exigirá maior aprofundamento e avaliação de outros compartimentos corporais para que conclusões mais robustas sejam delineadas. Apesar disso, as diferenças observadas entre o perfil de AG nas rações e aqueles incorporados às membranas celulares do tecido hepático sinalizam para uma intensa metabolização e sínteses de AG promovida pelos diferentes padrões de dieta. Embora os PUFA sejam biologicamente essenciais devido sua limitada síntese corporal (CURI, 2001), observamos que o grupo DH apresentou maior conteúdo de PUFA e MUFA, quando comparado ao grupo DF, destacando-se o acúmulo de ômega-6. Apesar desse perfil, chama a atenção à semelhança no conteúdo de ômega-3 nos três grupos experimentais. Os PUFA ômega-3 são AG de cadeia longa, com presença de ligação dupla, isto é, presença de insaturação (CALDER, 2017). A nível hepático, o ômega-3 promove a oxidação hepática de AG, reduzindo a síntese de TG a partir da inibição de SREBP-1c e ChREBP, isto é, fatores de transcrição nuclear que estimulam DNL (SCORLETTI, 2018).

Perfis lipídicos e inflamatórios, como analisados no presente estudo, variaram conforme a composição dietética, isto é, ratos alimentados com uma dieta rica em frutose ou hiperlipídica refletem distintamente no perfil hepático, como também foi observado por Jensen et al. (2018). Dietas ricas em frutose e lipídios também têm sido descritas como fatores importantes na ativação de enzimas inflamatórias hepáticas (MAZZOLI, 2021; PARRY, 2017) e no desenvolvimento de esteatose hepática (GOEDEKE et al., 2018; SCHULMAN, 2014; HYDES, 2021). No presente estudo, as concentrações séricas de AST, ALT e FA foram maiores no grupo DH, enquanto o grupo DF apresentou perfil semelhante ao grupo DC. O estudo de Fakhoury-Sayegh (2019) avaliou o efeito de diferentes concentrações de frutose (10%, 20% e 30%) adicionada na ração e *ad libitum*. Observou-se que os grupos com maior consumo de frutose apresentam menor concentração de AST, enquanto os animais com menor consumo, apresentam aumento na ALT.

Drescher et al. (2019) avaliaram o impacto das DH nas enzimas hepáticas e observaram que não houve um perfil único de resposta para as enzimas inflamatórias mais estudadas. Esses autores descreveram que as DH promoveram resposta semelhante na AST, enquanto que somente o grupo que consumiu DH apresentou maior concentração de ALT. De modo contrário, Miah et al., (2021) descreveram que ratos alimentados com DH apresentaram aumento de todas as enzimas hepáticas avaliadas (AST, ALT e FA).

Além das enzimas hepáticas, nós investigamos as mudanças nas concentrações de citocinas induzidas pelo elevado consumo de frutose e lipídios. Nossos resultados mostraram que os animais do grupo DF apresentaram a elevação de todas as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α). Houve também aumento na IL-10 no grupo DF. Surpreendentemente, a IL-10 e IL-6 no grupo DH foram menores que as concentrações observadas no grupo DC. De acordo com Basaranoglu (2013), o consumo excessivo e contínuo de frutose favorece a ativação e manutenção de diversas vias pró-inflamatórias. A inflamação crônica e de baixa intensidade, tipicamente observada ao nível plasmático (DE CASTRO, 2013; NAKAMURA & TERAUCHI, 2013) e também no tecido hepático (DISTEFANO, 2020; TAKAHASHI, 2012) pode preceder o desbalanço no metabolismo lipídico e favorecer o desenvolvimento da esteatose hepática. Embora esse perfil seja amplamente descrito na literatura, tanto em modelos animais, quanto em humanos, nossos resultados mostram que o excesso de frutose e lipídeos modula de modo diferente as vias inflamatórias.

Na última década, o papel bimodal da IL-10 nos processos inflamatórios tem atraído a atenção dos pesquisadores. De acordo com Wu (2022), a produção irregular de diversas citocinas, inclusive a IL-10, é capaz de promoverem a ativação do sistema imune e também a autotolerância. A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória importante para equilibrar tanto a resposta imune em um processo infeccioso e inflamatório, porém, assim como outras citocinas, como IL-19, IL-20, IL-22 e IL-26, são também importantes nos processos pró-inflamatórios.

Ademais, No estudo de Do (2018) também foi possível observar o aumento das citocinas IL-1 β e TNF- α , tanto nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (61% de gorduras), quanto naqueles que ingeriram dieta rica em frutose (65% de carboidratos na ração, sendo 85% na forma de frutose e 15% da sacarose).

Em conjunto, nossos resultados e outros previamente descritos mostram que diversas vias de sinalização inflamatória são capazes de agir ao nível hepático modulando negativamente o metabolismo lipídico (CHUNG et al., 2015). Foi possível observar no estudo de Glass & Olefsky (2012), que baixas doses de LPS são capazes de estimular a DNL e a lipólise, sendo ambas responsáveis pela efluxo de AGNE dentro do tecido hepático e, com isso, o aumento na produção de TG. O LPS é capaz de induzir a produção de diversas citocinas inflamatórias.

As vias inflamatórias retroalimentam a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, contribuindo para a modificação de biomoléculas envolvidas no desenvolvimento de diversas doenças (IM et al., 2021), incluindo as hepáticas. Considerando que o excesso no consumo de frutose e lipídios promoveu a ativação de citocinas inflamatórias e aumento de enzimas hepáticas, respectivamente, é plausível que essas alterações tenham estimulado os processos oxidativos. Nossos resultados mostraram um perfil contrário ao binômico inflamação-oxidação, onde os grupos DF e DH apresentaram valores de produtos de peroxidação lipídica (TBARS) inferiores ao grupo DC. Esse perfil foi observado na forma bruta de TBARS e após ajuste pela concentração de proteínas totais hepáticas. No estudo de Zaki (2019) avaliou o efeito da DH na concentração de TBARS em ratos, ao longo de 6 semanas de experimento. O grupo que ingeriu dieta rica em frutose (55% kcal/g adicionada na ração) apresentou concentração superior de TBARS hepático após ajuste pelas proteínas, quando comparado ao grupo controle.

Os resultados do presente estudo sinalizam para a ativação de vias inflamatórias e oxidativas associadas a alterações no metabolismo lipídico que são compatíveis com o desenvolvimento da esteatose hepática não alcóólica induzida pelo consumo excessivo de frutose e lipídios. Com base nestes parâmetros bioquímicos, investigamos alguns biomarcadores e realizamos a análise histológica associada à esteatose hepática. O grupo DF apresentou o peso relativo do fígado superior aos grupos DH e DC. O estudo de Jang et al. (2018) descreveu que a captação de frutose ao nível hepático é diretamente proporcional ao consumo, isto é, não há feedback negativo mesmo na presença de ingestão excessiva de frutose. É importante considerar o contexto do excesso no consumo de frutose, por exemplo: a dieta é normo ou hipercalórica? No estudo citado acima, observamos ingestão normocalórica, entretanto, no presente estudo, verificamos que o grupo DF apresentou uma ingestão calórica superior aos

grupos DC e DH, onde a frutose representou no mento final do experimento 31,74% dos carboidratos totais e 35,85% das calorias totais. Quando a frutose é absorvida pelo fígado, ela é fosforilada a partir da enzima KHK-C, produzindo precursores da gliconeogênese e da DNL, além de que a frutose dietética também promove a DNL (ZHAO et al., 2020); vias que podem explicar parcialmente o peso de fígado mais elevado no grupo DF.

O impacto dos lipídeos no desenvolvimento da esteatose hepática pode ser influenciado pela qualidade dos AG presentes na dieta (SILVA et al., 2017). Vários estudos observaram efeitos benéficos de uma dieta rica em PUFA na DHGNA, em modelos animais (CHEN et al., 2016; DEPNER, 2013; HANKE, 2013; SHANG et al., 2017; SONI, 2015). No estudo de Wang et al. (2017), animais que consumiram DH rica em AGS (45% das calorias) em um período de 4 dias apresentaram acúmulo de gordura no fígado, porém quando houve substituição parcial dos AGS pelos PUFA, houve reversão do acúmulo lipídico ao nível hepático. No estudo de Bargut (2014), observou-se que após 8 semanas de intervenção, o grupo que consumiu DH desenvolveu obesidade, esteatose hepática, hipertrigliceridemia e RI. Entretanto, os animais que receberam dieta hiperlipídica com alto teor de óleo de peixe, isto é, ômega-3 (238 g de óleo de peixe/kg de dieta), não desenvolveram as alterações descritas acima, tendo, apresentando também redução da lipogênese e elevação do processo de β -oxidação. Em sintonia com esses estudos, observamos que os animais que consumiram DH apresentaram maior infiltrado inflamatório e depósitos de gorduras, quando comparado aos grupos DF e DC. Esse perfil se contrapõe ao elevado peso relativo do fígado observado no grupo DF, embora esteja alinhado com o acúmulo de CT, TG e AGNE, observados no grupo DH.

Apesar dos avanços descritos na literatura, a etiologia da DHGNA permanece amplamente desconhecida. Embora a inflamação, o estresse oxidativo e as alterações lipídicas no tecido hepático estejam presentes na esteatose hepática, sua evolução parece depender de fatores genéticos. O presente estudo avaliou como a frutose e os lipídios modulam alguns destes marcadores. A PNPLA3 possui atividade semelhante à lipase, sendo capaz de promover a hidrólise das ligações éster dos TG no tecido hepático (KUMASHIRO et al., 2013). Um estudo realizado por Huang et al. (2010) com camundongos mostrou que a expressão do PNPLA3 é sensível às dietas ricas em carboidratos. Nossos resultados estiveram em sintonia com esse estudo ao mostrar que o

grupo DF apresentou maior concentração de PNPLA3, impactando possivelmente na modulação da SREBP-1c e ChREBP, que atuam no metabolismo lipídico ao nível hepático, estimulando a DNL.

De modo contrário, o FGF21 não apresentou mudança significativa entre os grupos, embora o grupo DH tenha sinalizado uma média absoluta superior aos demais grupos. O FGF21 está associado à captação de glicose no TA e também com processo oxidativo de AGNE pelo tecido hepático. Dessa forma, a presença do FGF21 reduz a ocorrência da esteatose hepática (KEINICKE et al., 2020; TANAKA et al., 2015; TILLMAN & ROLPH, 2020).

De modo semelhante, o TM6SF2 não variou entre os grupos, mas foi quantitativamente maior no grupo DH. O TM6SF2 é responsável pelo aumento da secreção de VLDL, frente a maior disponibilidade de AGNE no tecido hepático e, portanto, sua elevação, está envolvida na prevenção da infiltração lipídica ao nível hepático. Nos estudos de Newberry et al. (2021) e de Smagris (2016) a deleção de TM6SF2 hepático provocou redução na secreção de VLDL, o que estimulou o desenvolvimento de esteatose hepática, fibrose e até mesmo HCC destes animais.

No estudo de Lee (2015), realizado com ratos, que foram distribuídos em 4 grupos (dieta padrão, dieta rica em frutose diluída a 30% em água, dieta hiperlipídica e dieta com gordura e frutose), foi possível observar o desenvolvimento de esteatose hepática nos grupos que forneceram simultaneamente gordura e frutose, mas também no grupo DH, assim como no presente estudo. Além disso, no estudo de Do (2018), o qual os animais foram distribuídos em 4 grupos (dieta padrão, dieta rica em gordura, dieta rica em frutose e dieta rica em glicose), observamos que os animais que consumiram maior quantidade de gorduras apresentaram esteatose hepática grave, conforme observado nas análises histológicas. No estudo de Li et al. (2013) foi possível identificar a presença de infiltrado inflamatório nos animais que consumiram DH.

Embora muitos estudos experimentais tenham 5-6 animais por grupo, a ampla variabilidade observada entre os animais de um mesmo grupo pode ter impactado na análise estatística. Portanto, os resultados obtidos devem ser alvo de novos experimentos visando ampliar o tamanho amostral.

Como fortalezas, nossos resultados apresentam um amplo espectro de marcadores bioquímicos e histológicos, além do monitoramento de parâmetros de bem

estar animal, tais como consumo de ração e água *ad libitum*, que asseguraram uma ingestão calórica que garantiu ganho de peso e comprimento adequados ao longo dos 100 dias de experimento.

7. CONCLUSÃO

O excesso no consumo de frutose e lipídios promoveu danos ao tecido hepático. Embora a frutose tenha impactado negativamente nas citocinas inflamatórias, na enzima hepática (FA) e na PNPLA3, com consequente aumento no peso relativo do fígado; os animais submetidos à DH apresentaram maiores alterações lipídicas e inflamatórias ao nível hepático, marcadores que influenciaram o desenvolvimento de esteatose hepática. Portanto os resultados obtidos nos permitem concluir que ambos – frutose (30%) e lipídeos (90%), quando consumidos de forma crônica (100 dias) promovem inflamação e acúmulo de lipídeos ao nível hepático compatíveis com a DHGNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- Allard J, Le Guillou D, Begriche K, Fromenty B. Drug-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Pharmacol.* 2019;85:75-107. doi:10.1016/bs.apha.2019.01.003
- Andronesu CI, Purcarea MR, Babes PA. Doença hepática gordurosa não alcoólica: epidemiologia, patogênese e implicações terapêuticas. *J Med Life.* 2018; 11 (1): 20-23.
- Anekwe CV, Chandrasekaran P, Stanford FC. Ketogenic Diet-induced Elevated Cholesterol, Elevated Liver Enzymes and Potential Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Cureus.* 2020;12(1):e6605. Published 2020 Jan 8. doi:10.7759/cureus.6605
- Austin GL, Ogden LG, Hill JO. Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(4):836-843. doi:10.3945/ajcn.110.000141
- Bargut TC, Frantz ED, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. *Lipids.* 2014;49(5):431-444. doi:10.1007/s11745-014-3892-9
- Barnard DE, Lewis SM, Teter BB, Thigpen JE. Open- and closed-formula laboratory animal diets and their importance to research. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48(6):709-713.
- Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19(8):1166-1172. doi:10.3748/wjg.v19.i8.1166
- BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology.* 2017;66(4):1111-1124. doi:10.1002/hep.29273
- BasuRay S, Wang Y, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(19):9521-9526. Doi:10.1073/pnas.1901974116
- Berenyiova A, Golas S, Drobna M, Cebova M, Cacanyiova S. Fructose Intake Impairs the Synergistic Vasomotor Manifestation of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Rat Aorta. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4749. Published 2021 Apr 30. doi:10.3390/ijms22094749
- Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJM, Stock P, Menhofer D, Ebensing S, et al. Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology.* 2011; 152:1948-1960. doi:10.1210/en.2010-1423
- Bielohuby M, Sisley S, Sandoval D, et al. Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(9):E1059-E1070. doi:10.1152/ajpendo.00208.2013
- Brouns F. Overweight and diabetes prevention: is a low-carbohydrate-high-fat diet recommendable? [published correction appears in *Eur J Nutr.* 2019 Apr 16;:]. *Eur J Nutr.* 2018;57(4):1301-1312. doi:10.1007/s00394-018-1636-y
- Brunt EM, Wong VW, Nobili V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15080. Published 2015 Dec 17. doi:10.1038/nrdp.2015.80

Calder PC. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press; 2018;77(1):52-72.

Caussy C, Soni M, Cui J, et al. Nonalcoholic fatty liver disease with cirrhosis increases familial risk for advanced fibrosis. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2697-2704. doi:10.1172/JCI93465

Chen T, Yuan F, Wang H, et al. Perilla Oil Supplementation Ameliorates High-Fat/High-Cholesterol Diet Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats via Enhanced Fecal Cholesterol and Bile Acid Excretion. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2384561. doi:10.1155/2016/2384561

Chung KW, Lee EK, Kim DH, et al. Age-related sensitivity to endotoxin-induced liver inflammation: Implication of inflammasome/IL-1 β for steatohepatitis. *Aging Cell*. 2015;14(4):524-533. doi:10.1111/ace1.12305

Cotrim HP, Parise ER, Oliveira CP, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. *Ann Hepatol*. 2011;10(1):33-37.

Covelli, C. Guide to the necropsy of the mouse. Division of protection of man and ecosystems, ENEA, Rome, Italy. [acesso em 21 de julho de 2023]. Disponível em: http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/printable.php

Curi R, Pompeia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. 2001 ;[citado 2023 ago. 04]

Dhandapani PK, Lyyski AM, Paulin L, et al. Phenotypic effects of dietary stress in combination with a respiratory chain bypass in mice. *Physiol Rep*. 2019;7(13):e14159. doi:10.14814/phy2.14159

de Castro GS, Deminice R, Simões-Ambrosio LM, Calder PC, Jordão AA, Vannucchi H. O ácido docosahexaenoico e o ácido eicosapentaenoico na dieta influenciam o triacilglicérico hepático e a resistência à insulina em ratos alimentados com dieta rica em frutose. *Mar Drogas*. 2015;13(4):1864-1881. Publicado em 2015 de abril de 1. doi:10.3390/md13041864

de Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis*. 2013;12:136. Published 2013 Sep 18. doi:10.1186/1476-511X-12-136

Della Pepa G, Vetrani C, Lombardi G, Bozzetto L, Annuzzi G, Rivellese AA. Isocaloric Dietary Changes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Cardiometabolic Risk Individuals. *Nutrients*. 2017;9(10):1065. Published 2017 Sep 26. doi:10.3390/nu9101065

Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr(-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr*. 2013;143(3):315-323. doi:10.3945/jn.112.171322

Dias DDS, Bernardes N, Stoyell-Conti FF, Dos Santos CP, de Araujo AA, Llesuy S, Irigoyen MC, De Angelis K. Impact of combined exercise training on the development of cardiometabolic and neuroimmune complications induced by fructose consumption in hypertensive rats. *PLoS One*. 2020 Jun 10;15(6):e0233785. doi: 10.1371/journal.pone.0233785. Erratum in: *PLoS One*. 2020 Jul 6;15(7):e0235983.

Diehl AM, Day C. Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2063-2072. doi:10.1056/NEJMra1503519

Dietbox, 2023. [acesso em 21 de julho de 2023]. Disponível em: <https://dietbox.me/pt-BR>

- Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res.* 2006;3(1):15-23. doi:10.2174/156720206775541787
- DiStefano JK. Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(11):2079-2090. doi:10.1007/s00018-019-03390-0
- Drescher HK, Weiskirchen R, Fülöp A, et al. The Influence of Different Fat Sources on Steatohepatitis and Fibrosis Development in the Western Diet Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Front Physiol.* 2019;10:770. Published 2019 Jun 25. doi:10.3389/fphys.2019.00770
- Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients.* 2018;10(6):761. Published 2018 Jun 13. doi:10.3390/nu10060761
- Dong XC. PNPLA3-A Potential Therapeutic Target for Personalized Treatment of Chronic Liver Disease. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:304. Published 2019 Dec 17. doi:10.3389/fmed.2019.00304
- Dos Santos B, Schmitz AE, de Almeida GRL, et al. Fructose Intake Impairs Cortical Antioxidant Defenses Allied to Hyperlocomotion in Middle-Aged C57BL/6 Female Mice. *Neurochem Res.* 2020;45(12):2868-2883. doi:10.1007/s11064-020-03135-7
- Drabińska N, Juśkiewicz J, Wiczowski W. The Effect of the Restrictive Ketogenic Diet on the Body Composition, Haematological and Biochemical Parameters, Oxidative Stress and Advanced Glycation End-Products in Young Wistar Rats with Diet-Induced Obesity. *Nutrients.* 2022;14(22):4805. Published 2022 Nov 13. doi:10.3390/nu14224805
- Dustin SM, Stafstrom CE. Ketogenic Diet, but Not Polyunsaturated Fatty Acid Diet, Reduces Spontaneous Seizures in Juvenile Rats with Kainic Acid-induced Epilepsy. *J Epilepsy Res.* 2016;6(1):1-7. Published 2016 Jun 30. doi:10.14581/jer.16001
- Dyńska D, Kowalcze K, Paziewska A. The Role of Ketogenic Diet in the Treatment of Neurological Diseases. *Nutrients.* 2022;14(23):5003. Published 2022 Nov 24. doi:10.3390/nu14235003
- Ellenbroek JH, van Dijck L, Töns HA, et al. Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced β - and α -cell mass but no weight loss in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(5):E552-E558. doi:10.1152/ajpendo.00453.2013
- Eng JM, Estall JL. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol. *Cells.* 2021;10(7):1805. Published 2021 Jul 16. doi:10.3390/cells10071805
- ESHA Research, 2023. [acesso em 21 de julho de 2023]. Disponível em: <https://esha.com/products/food-processor/>
- Eslam M, Sanyal AJ, George J; International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2020;158(7):1999-2014.e1. doi:10.1053/j.gastro.2019.11.312
- Fakhoury-Sayegh N, Trak-Smayra V, Sayegh R, et al. Fructose threshold for inducing organ damage in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res.* 2019;62:101-112. doi:10.1016/j.nutres.2018.11.003

Ferramosca , A. , Conte , A. , Damiano , F. e Zara , V. (2014):Efeitos diferenciais de dietas ricas em carboidratos e gorduras na lipogênese hepática em ratos. *EUR. J. Nutr.* 53,1103–1114.

Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:223-241. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105339

Fuchs CJ, Gonzalez JT, van Loon LJC. Fructose co-ingestion to increase carbohydrate availability in athletes. *J Physiol.* 2019;597(14):3549-3560. doi:10.1113/JP277116

Fujikura Y, Sugihara H, Hatakeyama M, Oishi K, Yamanouchi K. Ketogenic diet with medium-chain triglycerides restores skeletal muscle function and pathology in a rat model of Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* 2021;35(9):e21861. doi:10.1096/fj.202100629R

Garbow JR, Doherty JM, Schugar RC, et al. Esteatose hepática, inflamação e estresse de ER em camundongos mantidos por longo prazo com uma dieta cetogênica de muito baixo carboidrato. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300 (6): G956-G967.

García-Berumen CI, Ortiz-Avila O, Vargas-Vargas MA, Del Rosario-Tamayo BA, Guajardo-López C, Saavedra-Molina A, Rodríguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria. *Lipids Health Dis.* 2019 Mar 30;18(1):78.

Garman TS, Setlow B, Orsini CA. Effects of a high-fat diet on impulsive choice in rats. *Physiol Behav.* 2021;229:113260. doi:10.1016/j.physbeh.2020.113260

Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012;15(5):635-645. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.001

Goedeke L, Bates J, Vatner DF, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology.* 2018;68(6):2197-2211. doi:10.1002/hep.30097

Gupta L, Khandelwal D, Kalra S, Gupta P, Dutta D, Aggarwal S. Ketogenic diet in endocrine disorders: Current perspectives. *J Postgrad Med.* 2017;63(4):242-251. doi:10.4103/jpgm.JPGM_16_17

Hall KD. A review of the carbohydrate-insulin model of obesity [published correction appears in *Eur J Clin Nutr.* 2017 May;71(5):679]. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(3):323-326. doi:10.1038/ejcn.2016.260

Hanke D, Zahradka P, Mohankumar SK, Clark JL, Taylor CG. A diet high in α -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89(6):391-401. doi:10.1016/j.plefa.2013.09.009

Harvey CJDC, Schofield GM, Williden M, McQuillan JA. The Effect of Medium Chain Triglycerides on Time to Nutritional Ketosis and Symptoms of Keto-Induction in Healthy Adults: A Randomised Controlled Clinical Trial. *J Nutr Metab.* 2018;2018:2630565. Published 2018 May 22. doi:10.1155/2018/2630565

Hooper L, Martin N, Jimoh OF, Kirk C, Foster E, Abdelhamid AS. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;8(8):CD011737. Published 2020 Aug 21. doi:10.1002/14651858.CD011737.pub3

Huang Y, He S, Li JZ, et al. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7892-7897. doi:10.1073/pnas.1003585107

Hydes T, Alam U, Cuthbertson DJ. The Impact of Macronutrient Intake on Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Too Much Fat, Too Much Carbohydrate, or Just Too Many Calories?. *Front Nutr*. 2021;8:640557. Published 2021 Feb 16. doi:10.3389/fnut.2021.640557

Im YR, Hunter H, de Gracia Hahn D, et al. A Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD. *Hepatology*. 2021;74(4):1884-1901. doi:10.1002/hep.31897

Izar MCO, Lottenberg AM, Giraldez VZR, et al. Declaração de Posicionamento sobre Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular - 2021 [a correção publicada consta em Arq Bras Cardiol. 2021 abr;116(4):855]. Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular – 2021 [correção publicada aparece em Arq Bras Cardiol. 2021 abr;116(4):855]. *Arq Bras Cardiol*. 2021;116(1):160-212. doi:10.36660/abc.20201340

Jahn D, Rau M, Wohlfahrt J, Hermanns HM, Geier A. Non-Alcoholic Steatohepatitis: From Pathophysiology to Novel Therapies. *Dig Dis*. 2016;34(4):356-363. doi:10.1159/000444547

Jang C, Hui S, Lu W, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metab*. 2018;27(2):351-361.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.016

Jensen VS, Hvid H, Damgaard J, et al. Dietary fat stimulates development of NAFLD more potently than dietary fructose in Sprague-Dawley rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:4. Published 2018 Jan 24. doi:10.1186/s13098-018-0307-8

Jiang W, Mao X, Liu Z, Zhang T, Jin L, Chen X. Global Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *J Clin Gastroenterol*. 2023;57(6):631-639. Published 2023 Jul 1. doi:10.1097/MCG.0000000000001739

Johnson RK, Lichtenstein AH, Anderson CAM, et al. Low-Calorie Sweetened Beverages and Cardiometabolic Health: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138(9):e126-e140. doi:10.1161/CIR.0000000000000569

Juanola O, Martínez-López S, Francés R, Gómez-Hurtado I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(10):5227. Published 2021 May 14. doi:10.3390/ijerph18105227

Jung CH, Choi KM. Impact of High-Carbohydrate Diet on Metabolic Parameters in Patients with Type 2 Diabetes. *Nutrients*. 2017;9(4):322. Published 2017 Mar 24. doi:10.3390/nu9040322

Kang SH, Lee HW, Yoo JJ, et al. KASL clinical practice guidelines: Management of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2021;27(3):363-401. doi:10.3350/cmh.2021.0178

Keinicke H, Sun G, Mentzel CMJ, et al. FGF21 regulates hepatic metabolic pathways to improve steatosis and inflammation. *Endocr Connect*. 2020;9(8):755-768. doi:10.1530/EC-20-0152

Kosinski C, Jornayvaz FR. Effects of Ketogenic Diets on Cardiovascular Risk Factors: Evidence from Animal and Human Studies. *Nutrients*. 2017;9(5):517. Published 2017 May 19. doi:10.3390/nu9050517

Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. 2014;46(4):352-356. doi:10.1038/ng.2901

- Kumashiro N, Yoshimura T, Cantley JL, et al. Role of patatin-like phospholipase domain-containing 3 on lipid-induced hepatic steatosis and insulin resistance in rats. *Hepatology*. 2013;57(5):1763-1772. doi:10.1002/hep.26170
- Lafoz E, Ruart M, Anton A, Oncins A, Hernández-Gea V. The Endothelium as a Driver of Liver Fibrosis and Regeneration. *Cells*. 2020;9(4):929. Published 2020 Apr 10. doi:10.3390/cells9040929
- Laughlin MR. Papéis normais para frutose dietética no metabolismo de carboidratos. *Nutrientes*. 2014;6(8):3117-3129. Publicado em 5 de agosto de 2014. doi:10.3390/nu6083117
- Lee JS, Jun DW, Kim EK, Jeon HJ, Nam HH, Saeed WK. Histologic and Metabolic Derangement in High-Fat, High-Fructose, and Combination Diet Animal Models. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:306326. doi:10.1155/2015/306326
- Li Y, Hai J, Li L, et al. Administration of ghrelin improves inflammation, oxidative stress, and apoptosis during and after non-alcoholic fatty liver disease development. *Endocrine*. 2013;43(2):376-386. doi:10.1007/s12020-012-9761-5
- Lian CY, Zhai ZZ, Li ZF, Wang L. High fat diet-triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chem Biol Interact*. 2020;330:109199. doi:10.1016/j.cbi.2020.109199
- Liao L, Chen X, Huang H, et al. Long non-coding RNA CASC7 is a promising serum biomarker for hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol*. 2023;23(1):324. Published 2023 Sep 21. doi:10.1186/s12876-023-02961-7
- Lien EL, Boyle FG, Wrenn JM, Perry RW, Thompson CA, Borzelleca JF. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. *Food Chem Toxicol*. 2001;39(4):385-392. doi:10.1016/s0278-6915(00)00142-3
- Lima PA, de Brito Sampaio LP, Damasceno NR. Ketogenic diet in epileptic children: impact on lipoproteins and oxidative stress. *Nutr Neurosci*. 2015;18(8):337-344. doi:10.1179/1476830515Y.0000000036
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W. *et al.* Distúrbios induzidos por dieta rica em frutose e gordura em ratos: impacto no risco de diabetes, complicações hepáticas e vasculares. *Nutr Metab (Londres)* **13**, 15 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0074-1>
- Luo F, Smagris E, Martin SA, et al. Hepatic TM6SF2 Is Required for Lipidation of VLDL in a Pre-Golgi Compartment in Mice and Rats. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;13(3):879-899. doi:10.1016/j.jcmgh.2021.12.008
- Mahmood, K, Cheema, MAR, & Haleem, DJ. O consumo de frutose diminui o ganho de peso corporal, reduz a ansiedade, modula a memória espacial e aumenta a dopamina, mas não o metabolismo da serotonina. *EC Neurology*. 2021; 11 (7), 551.
- Manne V, Handa P, Kowdley KV. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018;22(1):23-37. doi:10.1016/j.cld.2017.08.007
- Mazzoli A, Gatto C, Crescenzo R, Cigliano L, Iossa S. Prolonged Changes in Hepatic Mitochondrial Activity and Insulin Sensitivity by High Fructose Intake in Adolescent Rats. *Nutrients*. 2021;13(4):1370. Published 2021 Apr 19. doi:10.3390/nu13041370

- Maya-Romero AM, Dodd GE, Landin JD, et al. Adolescent high-fructose corn syrup consumption leads to dysfunction in adult affective behaviors and mesolimbic proteins in male Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res.* 2022;419:113687. doi:10.1016/j.bbr.2021.113687
- Miah P, Mohona SBS, Rahman MM, et al. Supplementation of cumin seed powder prevents oxidative stress, hyperlipidemia and non-alcoholic fatty liver in high fat diet fed rats. *Biomed Pharmacother.* 2021;141:111908. doi:10.1016/j.biopha.2021.111908
- Milutinović DV, Brkljačić J, Teofilović A, et al. Chronic Stress Potentiates High Fructose-Induced Lipogenesis in Rat Liver and Kidney. *Mol Nutr Food Res.* 2020;64(13):e1901141. doi:10.1002/mnfr.201901141
- Mhd Omar NA, Frank J, Kruger J, et al. Effects of High Intakes of Fructose and Galactose, with or without Added Fructooligosaccharides, on Metabolic Factors, Inflammation, and Gut Integrity in a Rat Model. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(6):e2001133. doi:10.1002/mnfr.202001133
- Moctezuma-Velázquez C. Current treatment for non-alcoholic fatty liver disease. Tratamiento actual de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed).* 2018;83(2):125-133. doi:10.1016/j.rgmx.2017.10.003
- Montesano A, Senesi P, Vacante F, et al. L-Carnitine counteracts in vitro fructose-induced hepatic steatosis through targeting oxidative stress markers. *J Endocrinol Invest.* 2020;43(4):493-503. doi:10.1007/s40618-019-01134-2
- Moore JB. From sugar to liver fat and public health: systems biology driven studies in understanding non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Proc Nutr Soc.* 2019;78(3):290-304. doi:10.1017/S0029665119000570
- Muriel P, López-Sánchez P, Ramos-Tovar E. Fructose and the Liver. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6969. Published 2021 Jun 28. doi:10.3390/ijms22136969
- Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21240-21257. Published 2013 Oct 24. doi:10.3390/ijms141121240
- NEPA/UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO. 4º ed. Campinas, SP, 2011.
- Neves SMP, Filho JM, Menezes EW de. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. FCF-IQ/USP. 2013.
- Newberry EP, Hall Z, Xie Y, et al. Liver-Specific Deletion of Mouse Tm6sf2 Promotes Steatosis, Fibrosis, and Hepatocellular Cancer. *Hepatology.* 2021;74(3):1203-1219. doi:10.1002/hep.31771
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Oliveira DT, Chaves-Filho AB, Yoshinaga MY, Paiva NCN, Carneiro CM, Miyamoto S, Festuccia WT, Guerra-Sá R. Liver lipidome signature and metabolic pathways in nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-sugar diet. *J Nutr Biochem.* 2021 Jan;87:108519
- Paoli A, Rubini A, Volek JS, Grimaldi KA. Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets [published correction appears in *Eur J Clin Nutr.* 2014 May;68(5):641]. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(8):789-796. doi:10.1038/ejcn.2013.116

- Parry SA, Hodson L. Influence of dietary macronutrients on liver fat accumulation and metabolism. *J Investig Med*. 2017;65(8):1102-1115. doi:10.1136/jim-2017-000524
- Pektas MB, Yücel G, Koca HB, et al. Dietary Fructose-Induced Hepatic Injury in Male and Female Rats: Influence of Resveratrol. *Drug Res (Stuttg)*. 2017;67(2):103-110. doi:10.1055/s-0042-118386
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):181-194. doi:10.1038/nri3623
- Peng KY, Watt MJ, Rensen S, et al. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res*. 2018;59(10):1977-1986. doi:10.1194/jlr.M085613
- Pereira ENGDS, Paula DP, de Araujo BP, et al. Advanced glycation end product: A potential biomarker for risk stratification of non-alcoholic fatty liver disease in ELSA-Brasil study. *World J Gastroenterol*. 2021;27(29):4913-4928. doi:10.3748/wjg.v27.i29.4913
- Phillipi, ST. Tabela de composição dos alimentos: suporte para decisão nutricional; Table of food composition: nutritional decision support. 2002.
- Prudencio MB, Lima PA, Freitas MCP, Cartolano FC, Murakami DK, Damasceno NRT. Ketogenic food pyramid for patients with refractory epilepsy: From theory to clinical practice. *Rev. Nutr*. 2017 Feb; 30(1): 99-108. doi: [10.1590/1678-98652017000100010](https://doi.org/10.1590/1678-98652017000100010)
- Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab*. 2017;25(2):262-284. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.022
- Rai RC, Bagul PK, Banerjee SK. NLRP3 inflammasome drives inflammation in high fructose fed diabetic rat liver: Effect of resveratrol and metformin. *Life Sci*. 2020;253:117727. doi:10.1016/j.lfs.2020.117727
- Raza S, Rajak S, Upadhyay A, Tewari A, Anthony Sinha R. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021;26(2):206-237. Published 2021 Jan 1. doi:10.2741/4892
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-1951. doi:10.1093/jn/123.11.1939
- Sandoval-Salazar C, Jiménez-García SN, Beltrán-Campos V, Vera-Becerra LE, Núñez-Colín CA. Effect of berrycactus fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) on glutamate, glutamine, and GABA levels in the frontal cortex of rats fed with a high-fat diet. *Open Life Sci*. 2023;18(1):20220529. Published 2023 Jan 24. doi:10.1515/biol-2022-0529
- Shang T, Liu L, Zhou J, et al. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):65. Published 2017 Mar 29. doi:10.1186/s12944-017-0461-2
- Schattenberg JM, Schuppan D. Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(6):479-488. doi:10.1097/MOL.0b013e32834c7cfc
- Shimada M, Shirouchi B, Kobayashi Y, et al. Treatment with Interleukin-25 Suppresses Short-Term High-Fructose Diet-Induced Hepatic Gene Expression and Activities of Fatty Acid Synthesis Enzymes in Rats. *J Oleo Sci*. 2023;72(1):99-104. doi:10.5650/jos.ess22266

- Scholl J. Traditional dietary recommendations for the prevention of cardiovascular disease: do they meet the needs of our patients?. *Cholesterol*. 2012;2012:367898. doi:10.1155/2012/367898
- Shulman GI. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease [published correction appears in *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2241]. *N Engl J Med*. 2014;371(12):1131-1141. doi:10.1056/NEJMra1011035
- Schwarz JM, Noworolski SM, Erkin-Cakmak A, et al. Effects of Dietary Fructose Restriction on Liver Fat, De Novo Lipogenesis, and Insulin Kinetics in Children With Obesity. *Gastroenterology*. 2017;153(3):743-752. doi:10.1053/j.gastro.2017.05.043
- Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence of efficacy and mechanism of action. *Mol Aspects Med*. 2018;64:135-146. doi:10.1016/j.mam.2018.03.001
- Silva Figueiredo P, Carla Inada A, Marcelino G, et al. Fatty Acids Consumption: The Role Metabolic Aspects Involved in Obesity and Its Associated Disorders. *Nutrients*. 2017;9(10):1158. Published 2017 Oct 22. doi:10.3390/nu9101158
- Smagris E, Gilyard S, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of Tm6sf2, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *J Biol Chem*. 2016;291(20):10659-10676. doi:10.1074/jbc.M116.719955
- Softic S, Stanhope KL, Boucher J, et al. Fructose and hepatic insulin resistance. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(5):308-322. doi:10.1080/10408363.2019.1711360
- Soni NK, Nookaew I, Sandberg AS, Gabrielsson BG. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis*. 2015;14:74. Published 2015 Jul 22. doi:10.1186/s12944-015-0072-8
- Souza AFP, Woyames J, Miranda RA, et al. Maternal Isocaloric High-Fat Diet Induces Liver Mitochondria Maladaptations and Homeostatic Disturbances Intensifying Mitochondria Damage in Response to Fructose Intake in Adult Male Rat Offspring. *Mol Nutr Food Res*. 2022;66(8):e2100514. doi:10.1002/mnfr.202100514
- Szabó J, Maróti G, Solymosi N, et al. Fructose, glucose and fat interrelationships with metabolic pathway regulation and effects on the gut microbiota. *Acta Vet Hung*. 2021;69(2):134-156. Published 2021 Jul 2. doi:10.1556/004.2021.00022
- Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(19):2300-2308. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2300
- Tanaka N, Takahashi S, Zhang Y, et al. Role of fibroblast growth factor 21 in the early stage of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1242-1252. doi:10.1016/j.bbadis.2015.02.012
- Tao Y, Leng SX, Zhang H. Ketogenic Diet: An Effective Treatment Approach for Neurodegenerative Diseases. *Curr Neuropharmacol*. 2022;20(12):2303-2319. doi:10.2174/1570159X20666220830102628
- Tappy L. Fructose metabolism and noncommunicable diseases: recent findings and new research perspectives. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2018;21(3):214-222. doi:10.1097/MCO.0000000000000460

Tappy L, Rosset R. Fructose Metabolism from a Functional Perspective: Implications for Athletes. *Sports Med.* 2017;47(Suppl 1):23-32. doi:10.1007/s40279-017-0692-4

Taskinen MR, Packard CJ, Borén J. Dietary Fructose and the Metabolic Syndrome. *Nutrients.* 2019;11(9):1987. Published 2019 Aug 22. doi:10.3390/nu11091987

Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients.* 2017;9(9):981. Published 2017 Sep 6. doi:10.3390/nu9090981

Tillman EJ, Rolph T. FGF21: An Emerging Therapeutic Target for Non-Alcoholic Steatohepatitis and Related Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:601290. Published 2020 Dec 14. doi:10.3389/fendo.2020.601290

Zaki SM, Fattah SA, Hassan DS. The differential effects of high-fat and high- fructose diets on the liver of male albino rat and the proposed underlying mechanisms. *Folia Morphol (Warsz).* 2019;78(1):124-136. doi:10.5603/FM.a2018.0063

Zhang Q, Xu L, Xia J, Wang D, Qian M, Ding S. Tratamento de camundongos diabéticos com uma combinação de dieta cetogênica e exercício aeróbico por meio de modulações de programas genéticos PPARs. *PPAR Res.* 2018; 2018: 4827643.

Zhang X, Qin J, Zhao Y, Shi J, Lan R, Gan Y, et al. Long-term ketogenic diet contributes to glycemic control but promotes lipid accumulation and hepatic steatosis in type 2 diabetic mice. *Nutrition Research.* 2016; 36:349-358. doi: 10.1016/j.nutres.2015.12.002

Zhao, S, Jang, C, Liu, J. *et al.* A fructose dietética alimenta a lipogênese hepática via acetato derivado da microbiota. *Natureza.* 2020; **579**:586–591. doi:10.1038/s41586-020-2101-7

Yamazaki M, Yamada H, Munetsuna E, Ishikawa H, Mizuno G, Mukuda T, Mouri A, Nabeshima T, Saito K, Suzuki K, Hashimoto S, Ohashi K. Excess maternal fructose consumption impairs hippocampal function in offspring via epigenetic modification of BDNF promoter. *FASEB J.* 2018 May;32(5):2549-2562.

Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *J Hepatol.* 2019;70(3):531-544. doi:10.1016/j.jhep.2018.10.033

Yki-Järvinen H. Nutritional Modulation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Nutrients.* 2015;7(11):9127-9138. Published 2015 Nov 5. doi:10.3390/nu7115454

Wang C, Liu W, Yao L, et al. Hydroxyecosapentaenoic acids and epoxyecosatetraenoic acids attenuate early occurrence of nonalcoholic fatty liver disease. *Br J Pharmacol.* 2017;174(14):2358-2372. doi:10.1111/bph.13844

Wang Y, Kory N, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. PNPLA3, CGI-58, and Inhibition of Hepatic Triglyceride Hydrolysis in Mice. *Hepatology.* 2019;69(6):2427-2441. doi:10.1002/hep.30583

Willis SA, Sargeant JA, Yates T, et al. Acute Hyperenergetic, High-Fat Feeding Increases Circulating FGF21, LECT2, and Fetuin-A in Healthy Men. *J Nutr.* 2020;150(5):1076-1085. doi:10.1093/jn/nxz333

Wilson J, Lowery R. *A bíblia cetogênica: o guia oficial da cetose.* 2017. Simon e Schuster.
Wiss DA, Criscitelli K, Gold M, Avena N. Evidências pré-clínicas para o potencial de dependência de alimentos altamente palatáveis: Desenvolvimentos atuais relacionados à influência materna. *Appetite.* 2017; 115, 19-27. doi: 10.1016/j.appet.2016.12.019

Woodie L, Blythe S. Os efeitos diferenciais de dietas ricas em gordura e frutose na fisiologia e comportamento em ratos machos. *Nutritional Neuroscience*. 2018;21(5):328-336.

Worm N. Beyond Body Weight-Loss: Dietary Strategies Targeting Intrahepatic Fat in NAFLD. *Nutrients*. 2020;12(5):1316. Published 2020 May 6. doi:10.3390/nu12051316

Wu YR, Hsing CH, Chiu CJ, Huang HY, Hsu YH. Roles of IL-1 and IL-10 family cytokines in the progression of systemic lupus erythematosus: Friends or foes?. *IUBMB Life*. 2022;74(2):143-156. doi:10.1002/iub.2568

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Protocolos de coleta de dados.

Protocolo 1- Identificação dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: formulário padrão, caneta permanente, luva para manipular animal .

No dia 1 do experimento (**T0**), logo após o recebimento dos animais:

1. Identificar cada animal utilizando caneta permanente;
2. Marque a cauda do animal com 1-2-3-4-5-6, linhas fortes contínuas a depender do número de animais;
3. No formulário de identificação registre cada animal ao seu ID (numérico) de com o grupo de intervenção:

2 primeiros dígitos – Grupo

2 últimos dígitos – ID animal

0101 – Grupo Controle e recebendo dieta ração comercial e água filtrada

0201 – Grupo recebendo dieta ração comercial e água filtrada enriquecida com frutose

0301 – Grupo recebendo dieta hiperlipídica e água filtrada

4. Identificar cada caixa com a respectiva dupla de animais. Utilize uma ficha/cartão padrão plastificado a ser fixado na parte externa de cada caixa;

⇒ Número do CEUA

⇒ Nome do pesquisador responsável

⇒ Telefone de contato para emergências

⇒ Identificação do grupo experimental

⇒ Identificação dos animais

⇒ Número da gaiola

Protocolo 2- Mensuração do peso dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: Ficha de monitoramento do peso, caneta, balança digital, pilhas, caixa para pesar animais, luvas para manipular animal.

Para a mensuração do peso dos animais adotar o seguinte protocolo:

- 1- No dia anterior até o momento de pesagem dos animais não suspender a ingestão de ração e de água;
- 2- No dia da pesagem dos animais escolher um horário para a pesagem dos animais e registrá-lo. Por ordem de ID prosseguir com a pesagem dos animais. O horário de pesagem dos animais e a ordem dos mesmos deverá ser mantida nos experimentos seguintes;

- 3- Separar uma caixa para que o animal possa ser acondicionado durante a pesagem;
- 4- Ligar a balança e certificar-se que a mesma se encontra zerada;
- 5- Colocar a caixa sobre a superfície da balança de forma centralizada e na sequência tarar a balança. Pegue o animal pelo dorso e transfira-o da gaiola para a caixa, após estabilização da balança registre o peso do animal adotando duas casas decimais como referência. Repita esse processo 3 dias consecutivos e posteriormente calcule a média de peso. Registre o peso final nas respectivas fichas de avaliação;
- 6- Repetir esse procedimento nos 3 últimos dias antes de iniciar cada proporção (1:1; 2:1; 4:1) da DC e nos 3 últimos dias de experimento;
- 7- No **T0** de experimentação e antes do início da dieta calcule a média de peso e o IMC (Índice de Lee) dos animais. Após essa etapa, distribua os animais entre os grupos de intervenção de modo que cada grupo fique pareado;
- 8- Utilizar formulário padrão para registrar o peso dos animais por grupo experimental, por dia, por gaiola, por animal e sua respectiva média;
- 9- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento;

Protocolo 3 - Mensuração do comprimento nasocaudal dos animais

ITENS NECESSÁRIOS: ficha de monitoramento do comprimento, caneta, luvas para manipular animal, régua de 30 cm, fita crepe.

- 1- No **T0**, **T4** e **T5** realizar a mensuração do comprimento dos animais sem suspensão da ingestão de ração e água;
- 2- Pegue o animal pelo dorso e coloque o mesmo em posição ventral em uma superfície plana;
- 3- Utilizando uma fita métrica inelástica ou uma régua, fixada com fita crepe em uma superfície plana;
- 4- Posicione o animal de forma paralela à fita/régua e faça a aferição da medida nasocaudal, conforme **Figura 1**;
- 5- Repita 3 vezes consecutivas essa medida e registre o comprimento do animal utilizando uma casa decimal de referência;
- 6- Calcule a média do comprimento nasocaudal de cada dia de coleta.
- 7- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

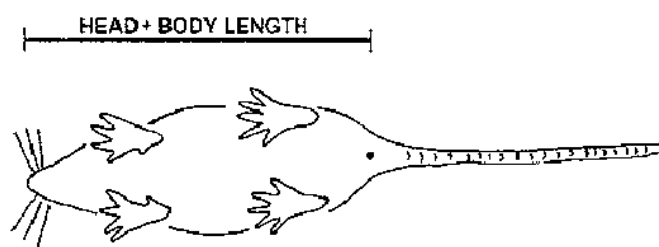


Figura 1. Aferição da medida nasocaudal.

Protocolo 4 - Avaliação de ingestão hídrica e de ração

ITENS NECESSÁRIOS: Formulário para registro de consumo hídrico, formulário para registro de consumo de ração, luvas para manipulação de animais, caneta, proveta graduada, balança digital, pilhas.

- 1- A ingestão hídrica e de ração será avaliada e registrada durante três dias consecutivos e, posteriormente, será obtido uma média por gaiola e por animal, considerando que cada gaiola terá 2 animais;
- 2- Determinar um horário para dispor a ração e a água nas gaiolas, e no dia seguinte no mesmo horário seguir com o registro de consumo;
- 3- Antes de distribuir a ração e a água nas gaiolas:
 - Pese a ração utilizando balança de precisão e registre o peso em gramas usando uma casa decimal;
 - Meça a quantidade de água usando uma proveta e anote a quantidade em ml administrada;
- 4- No dia seguinte pesar e medir o volume de sobra de ração e água por gaiola e registrar na ficha de avaliação e completar com mais ração e água, fazendo o devido registro;
- 5- Deverá ser considerado como sobra de ração apenas a quantidade armazenada na grade de alimentação, sobras que estejam dentro da gaiola devem ser desconsideradas;
- 6- Utilizar formulário padrão para registrar a ingestão hídrica e de ração por grupo experimental, por dia, por gaiola, por animal e sua respectiva média;
- 7- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

Protocolo 5 – Monitoramento da cetose sanguínea e glicemia

ITENS NECESSÁRIOS: xilol, algodão/cotonete, luvas, agulha para punção 18x30/seringa de insulina, fita de cetose, fita de glicose, monitor de cetose/glicose, formulário padrão para registro de cetose sanguínea e glicemia.

- 1- O monitoramento da cetose sanguínea e glicemia serão realizados entre o momento T4 e T5 e no final do experimento (T5);
- 2- O sangue deve ser coletado pela cauda de cada animal;
- 3- Para facilitar a punção da veia caudal será aplicado com algodão xilol e após 5 minutos será realizada a punção;
- 4- O sangue será aplicado diretamente sobre a fita de cetose/glicose e essa será imediatamente lida pelo monitor;

- 5- Utilizar formulário padrão para registrar os valores de cetose sanguínea e de glicemia por animal e por dia;
- 6- O pesquisador deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

Protocolo 6 – Sacrifício dos animais, coleta de sangue e retirada de órgãos

ITENS NECESSÁRIOS: caixa de armazenagem (10x10 cm), cilindro de gás carbônico, guilhotina, isopor, alfinetes, pinças, tesouras cirúrgicas, bisturis;

1. Identifique cada formulário conforme grupo, ID e data. Prepare 01 ficha para cada animal;
2. O animal deve ser colocado em caixa de armazenagem, a qual deve ser tampada por um objeto de vidro que tenha um acesso central para receber, com o auxílio de uma mangueira, o gás carbônico advindo do cilindro;
3. Esperar por cerca de 1 minuto e meio (quando o animal estiver desmaiado), desligar o cilindro, esperar por mais 1 minuto e guilhotina-lo;
4. Após a decapitação, coletar o sangue utilizando 1 tubo falcon de 50 ml, previamente identificado, contendo 5 ml de EDTA a 10% (espera-se obter de 4-5 ml de sangue). Homogeneizar o sangue com EDTA, vagarosamente;
5. Mantenha o tubo falcon protegido da luz e imediatamente transferido para a geladeira;
6. O sangue obtido será centrifugado (3000 rpm, 15 min, 4°C), sendo o sobrenadante transferido para uma proveta para aferição e registro do volume;
7. Acrescentar os inibidores de proteases, aprotinina (10 µg/mL), benzamidina (10 µM), fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (5 µM) e o antioxidante 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno-BHT (100 µM), conforme proporção de plasma obtido;
8. Distribuir plasma em cada eppendorf identificado e distribuir volumes, conforme tipos e quantidades de análises a serem feitas;
9. Transportar 1,5-2 ml do concentrado de hemácias para tubo eppendorf de 2-3 ml;
10. Armazenar plasma e hemácias a -80°C até momento das análises;
11. Em paralelo a armazenagem no sangue coletado na geladeira, iniciar procedimento cirúrgico para retirada dos órgãos perfundidos, utilizando isopor para posicionar o animal, alfinetes para fixar os animais ao isopor, pinças, tesouras cirúrgicas, bisturis para coleta dos órgãos;
12. Identificar cada órgão, fazer limpeza por imersão em solução fisiológica, pesar e registrar em formulário padrão;
13. Seguindo proporcionalidade anatômica, cada órgão deverá dividido em 2 partes. Uma das partes irá para a preparação de lâminas (H/E, imuno-histoquímica), sendo assim, armazenados embalados em papel alumínio no freezer -80°C;
14. A outra parte dos tecidos serão armazenados em formaldeído e mantidos em geladeira até a realização das análises;

15. Utilizar formulário padrão para registrar as informações referentes à coleta de sangue total, sacrifício e retirada de órgãos, segundo grupo experimental, dia, por animal;
16. O pesquisador responsável por cada etapa deve assinar o formulário ao término de cada dia de monitoramento.

APÊNDICE 2. Fichas de monitoramento dos animais.



MONITORAMENTO DO PESO DO ANIMAL

| |
|--|
| ID: _____ CEUA: _____ |
| MOMENTO DO ESTUDO: _____ |
| Peso – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Peso – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Peso – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Média do Peso (g): _____ |
| Pesquisador: _____ |

| |
|--|
| ID: _____ CEUA: _____ |
| MOMENTO DO ESTUDO: _____ |
| Peso – dia 1 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Peso – dia 2 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Peso – dia 3 (g): _____ Data: ___/___/___ Horário: _____ |
| Média do Peso (g): _____ |
| Pesquisador: _____ |

MONITORAMENTO DO COMPRIMENTO NASOCAUDAL DO ANIMAL**ID:** _____ **CEUA:** _____**MOMENTO DO ESTUDO:** _____ **Data:** ___/___/___
Horário: _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Média do Comprimento – dia 1 (cm): _____**Pesquisador:** _____**ID:** _____ **CEUA:** _____**MOMENTO DO ESTUDO:** _____ **Data:** ___/___/___
Horário: _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Comprimento – dia 1 (cm): _____

Média do Comprimento – dia 1 (cm): _____**Pesquisador:** _____

MONITORAMENTO DO CONSUMO DE ÁGUA

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de água – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de água – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de água – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Média do consumo de água (g): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de água – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de água – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de água – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Média do consumo de água (g): _____

Pesquisador: _____



MONITORAMENTO DO CONSUMO DE RAÇÃO

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de ração – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de ração – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de ração – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Média do consumo de ração (g): _____

Coefficiente de Eficácia Alimentar (CEA): _____

Pesquisador: _____

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

Consumo de ração – dia 1 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de ração – dia 2 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Consumo de ração – dia 3 (g): _____ **Data:** ___/___/___ **Horário:**

Média do consumo de ração (g): _____

Coefficiente de Eficácia Alimentar (CEA): _____

Pesquisador: _____



MONITORAMENTO DE CETOSE E GLICEMIA SANGUÍNEA

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

| | CETOSE SANGUÍNEA | GLICEMIA |
|-------------|-------------------------|-----------------|
| DATA | | |

Pesquisador: _____

ID: _____ **CEUA:** _____

MOMENTO DO ESTUDO: _____

| | CETOSE SANGUÍNEA | GLICEMIA |
|-------------|-------------------------|-----------------|
| DATA | | |

Pesquisador: _____

FICHA DO SACRIFÍCIO

CEUA: _____ ID: _____

Grupo: _____

Data __/__/__ Horário: __: __ até __: __

Técnica de sacrifício: Guilhotina

Responsável: _____

Técnica de fixação:

Solução de fixação: _____

Quantidade: _____

Responsável: _____

Retirada de órgãos:

| ÓRGÃO | LIMPEZA | PESO |
|--------------------|---------|------|
| Cérebro (restante) | | |
| Hipocampo | | |
| Hipotálamo | | |
| Lobo frontal | | |
| Rins | | |
| Fígado | | |
| Coração | | |
| Baço | | |
| Pâncreas | | |
| Pulmões | | |
| Intestino | | |
| TA visceral | | |
| TA subcutâneo | | |
| Músculo | | |

Responsável: _____

Destino da carcaça:

Armazenagem da carcaça: _____

Lacre: _____

Local de descarte: _____

Responsável pelo descarta: _____

ANEXOS

ANEXO 1. Termo de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP).



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Avenida Dr. Arnaldo, 455

Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios”**, registrada com o nº **1696/2021**, sob a responsabilidade de **Nágila Raquel Teixeira Damasceno** e **Júlia Galbiati de Souza**, apresentada pela Faculdade de Saúde Pública da USP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 05/11/2021

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Início: 01-12-2021 Término: 31-12-2022 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato wistar |
| Nº de animais | 56 |
| Peso/Idade | 8 semanas |
| Sexo | machos |
| Origem | Biotério do ICB |

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 05 de novembro de 2021



Dr. Eduardo Pompeu

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP

e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO 2. Termo de outorga e aceitação de auxílios.



Para uso exclusivo da
FAPESP

Folha: ___ Volume: ___

Rubrica: ___

Anexo 2. Termo de outorga e aceitação de auxílios.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS PROCESSO

2020/03529-6

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.

- 1. OUTORGADO:** Nágila Raquel Teixeira Damasceno
CPF: 480.082.493-15
RG: 39202677-SSP/SP
- 2. Correspondência:** Rua Anete Queiroz Lacerda - 136, Jardim Bonfiglioli, São Paulo/SP, CEP
05591-080
nagila@usp.br
- 3. Instituição Sede:** Faculdade de Saúde Pública/FSP
Universidade de São Paulo/USP
- 4. Projeto de Pesquisa:** Dieta cetogênica e Epilepsia: Uma abordagem nutricional focada na modulação morfofuncional do eixo cérebro-intestino e seus aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios
- 5. Linha de Fomento:** Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
- 6. Área/Subárea:** Nutrição
Bioquímica da Nutrição
- 7. Coordenação:** Saúde I
- 8. Período da Vigência:** 01/02/2021 a 31/01/2023
- 9. Relatórios Científicos:** 30/01/2022, 28/02/2023
- 10. Prestações de Contas:** 28/02/2022, 28/02/2023

CURRÍCULO LATTES



Júlia Galbiati de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2633696569807325>

ID Lattes: **2633696569807325**

Última atualização do currículo em 05/05/2021

Atualmente, mestranda em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública (FSP) da universidade de São Paulo (USP), bolsista CAPES. Graduada em Nutrição pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG). Possui Especialização em Atenção Cardiovascular, a partir do Programa de Residência Multiprofissional com ênfase em Cardiologia no Hospital São Paulo (HSP), o qual é vinculado a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/SP). Atua nas áreas de Nutrição Clínica e Nutrição nas Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), com ênfase nas doenças cardiovasculares. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

| | |
|--|---|
| Nome | Júlia Galbiati de Souza |
| Nome em citações bibliográficas | SOUZA, J. G. |
| Lattes ID | http://lattes.cnpq.br/2633696569807325 |

Endereço

Formação acadêmica/titulação

| | |
|--------------------|---|
| 2021 | Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Impacto das Dietas High-fat Low-carb (HFLC) e High-carb Low-fat (HCLF) no Desenvolvimento da Esteatose Hepática no Contexto da Epilepsia. Orientador: Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. |
| 2019 - 2021 | Especialização em Atenção Cardiovascular. (Carga Horária: 5760h). Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. Título: ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE TERAPIA NUTRICIONAL ENTERAL NO CHOQUE CARDIOGÊNICO. Orientador: Dr ^º Ana Lúcia da Silva Castro Montolezi. Bolsista do(a): Ministério da Educação, ME, Brasil. |
| 2014 - 2018 | Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG, Brasil. Título: Capacidade de indicadores antropométricos e dietéticos na predição de alterações na pressão arterial em adultos do município de Alfenas-MG. Orientador: Fernanda de Carvalho Vidigal. |
| 2008 - 2010 | Ensino Médio (2º grau). Fundação Educacional da Alta Mogiana, FEAM%20COC, Brasil. |

Formação Complementar

| | |
|--------------------|--|
| 2021 - 2021 | Como fazer citação e referência de acordo com a ABNT. (Carga horária: 5h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil. |
| 2021 - 2021 | O potencial inexplorado da fidelização. (Carga horária: 4h). Amor em Nutrir, AMOR EM NUTRIR, Brasil. |
| 2020 - 2020 | Atualizações em Prevenção de Doenças Cardiovasculares. (Carga horária: 4h). Secad, SECAD, Brasil. |
| 2020 - 2020 | Propedêutica cardiovascular na atenção básica. (Carga horária: 60h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. |
| 2020 - 2020 | Abordagem do sobrepeso e obesidade na atenção primária à saúde. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil. |
| 2020 - 2020 | |



Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8729581028091781>

ID Lattes: **8729581028091781**

Última atualização do currículo em 07/08/2023

Professora Associada do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), responsável pelo grupo de pesquisa em Oxidações Biológicas e Metabolismo Lipídico Aplicado às Doenças Crônicas Não Transmissíveis (OxLIPID) e coordenadora do Laboratório de Bioquímica da Nutrição Aplicada às Doenças Crônicas Não Transmissíveis. Nos últimos anos tem coordenado pesquisas na área de Nutrição e Doenças Crônicas (DCV, Obesidade, câncer, Epilepsia e Doenças Neurodegenerativas), com ênfase em aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios modulados por ácidos graxos e outros componentes nutricionais. É orientadora dos Programas de Pós-graduação em Nutrição e Saúde Pública e Pós-graduação em Cardiologia. É Diretora da Divisão de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário (HU-USP), membro da Diretoria do Departamento de Nutrição da SOCESP, membro do Conselho Deliberativo do Instituto Nacional de Fluidos Complexos (INCT-FCx) e Núcleo de Pesquisas em Fluidos Complexos (NAP-FCx), além de fazer parte de comissões universitárias (Congregação, Conselho do Departamento de Nutrição, Biossegurança e Residência Multiprofissional). Coordenou o Programa de Cooperação Internacional Brasil-Suécia (CAPES-STINT, 2014-2018) e, atualmente, colabora com projeto de cooperação internacional Brasil-Alemanha (FAPESP-FAPESC-Greifswald, desde 2018). Mantém colaborações científicas nacionais (UFPI, UECE, UFC, UFF, FURB) e internacionais (Universidade de Harvard, Universidade de Barcelona, Universidade de Umea e Universidade de Greifswald). Tem intensa atuação ao nível de extensão universitária, tendo concedido mais de 50 entrevistas e coordenado mais de 20 projetos nos últimos 5 anos. Em parceria com a SOCESP, Centro Universitário São Camilo e INCT-FCx, é coordenadora da Plataforma EAD para capacitação de professores de ensino básico e médio sobre Educação Alimentar e Nutricional como estratégia para a prevenção de doenças cardiovasculares e morbidades associadas PEDUCA. (Texto informado pelo autor)

Identificação

| | |
|--|--|
| Nome | Nágila Raquel Teixeira Damasceno |
| Nome em citações bibliográficas | DAMASCENO, N. R. T.; DAMASCENO, NAGILA RAQUEL TEIXEIRA; DAMASCENO, N. R. T.; DAMASCENO, NÁGILA RAQUEL TEIXEIRA; DAMASCENO, NÁGILA R.; DAMASCENO, NÁGILA R.; Damasceno NR; DAMASCENO, NR; Damasceno NRT; TEIXEIRA DAMASCENO, NÁGILA RAQUEL; DAMASCENO, NÁGILA; DAMASCENO, NAGILA R. T.; DAMASCENO, NÁGILA R. T. |
| Lattes ID |  http://lattes.cnpq.br/8729581028091781 |
| Orcid ID |  https://orcid.org/0000-0002-9332-7816 |

Endereço

| | |
|------------------------------|--|
| Endereço Profissional | Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo, 715 Pacaembu 01246904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (011) 30617865 Fax: (011) 30617701 URL da Homepage: http://www.usp.br |
|------------------------------|--|

Formação acadêmica/titulação

| | |
|--------------------|--|
| 1997 - 2001 | <p>Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência das Isoflavonas Extraídas da Soja na Hipercolesterolemia e na Aterosclerose Experimental Induzida pela Caseína, Ano de obtenção: 2001. Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Isoflavonas; Caseína; Oxidação; Lipoproteínas; Anticorpos; Aterosclerose. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Alergologia e Imunologia Clínica. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Endocrinologia. Setores de atividade: Fabricação de Produtos Químicos; Fabricação de Produtos Farmacêuticos; Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana.</p> |
| 1995 - 1997 | <p>Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência da Proteína Isolada da Soja e da Caseína no Desenvolvimento da Aterosclerose Experimental em Coelho, Induzida pela Dieta Rica em Colesterol, Ano de Obtenção: 1997. Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: Soja; Caseína; Aterosclerose; Colesterol; Anticorpos; hipercolesterolemia. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Alergologia e Imunologia Clínica. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Endocrinologia. Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Desenvolvimento de Produtos Tecnológicos Voltados Para A Saúde Humana; Fabricação de Produtos Farmacêuticos.</p> |
| 1988 - 1995 | <p>Graduação em Nutrição. Universidade Estadual do Ceará, UECE, Brasil. Título: Colesterol: um bio-marcador para o câncer de cólon. Orientador: Augusto Reinaldo Pimental Quimarães. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.</p> |
| 1986 - 1988 | <p>Curso técnico/profissionalizante.</p> |
| 1985 - 1987 | <p>Escola Técnica Federal do Ceará, FEDERAL, Brasil. Ensino Médio (2º grau).</p> |
| 1977 - 1984 | <p>Colégio Municipal Filgueiras Lima, MUNICIPAL, Brasil. Ensino Fundamental (1º grau). Escola de 1 Grau Marechal Juarez Távora, PUBLICA, Brasil.</p> |

Pós-doutorado e Livre-docência

| | |
|--------------------|--|
| 2013 | <p>Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Excesso de Peso na Adolescência: Uma Abordagem Nutricional e Metabólica de um Problema de Saúde Pública, Ano de obtenção: 2013.</p> |
| 2009 - 2010 | <p>Pós-Doutorado. Universidade de Barcelona, UB, Espanha. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.</p> |
| 2003 - 2004 | <p>Pós-Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Bolsista do(a): Instituto Danone, DANONE, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.</p> |