UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATAS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E O ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO.

ISABEL CRISTINA MALLOSTO EMERICH DE ABREU

Ouro Preto, MG.

2013

ISABEL CRISTINA MALLOSTO EMERICH DE ABREU

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATAS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E O ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição como requisito para a obtenção do título de mestre em Saúde e Nutrição.

Orientadora: Maria Lúcia Pedrosa

Co-orientadora: Maísa Silva

Ouro Preto, MG.

2013

Mestrado
Saúde e Nutrição
Universidade Federal de Ouro Preto

ATA DA DEFESA PÚBLICA DE MESTRADO

Aos 11 dias do mês de março de 2013, às 9h00min no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a defesa da dissertação da aluna Isabel Cristina Mallosto Emerich de Abreu. A banca examinadora definida anteriormente foi composta pelos professores Dra. Silvia Dantas Cangussú (UFOP), Dra. Ana Carolina Pinheiro Volp (UFOP), Dra. Maria Lúcia Pedrosa (UFOP) e Dra. Maisa Silva (UFOP). Dando início ao exame a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: ***"CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS HIPERCOLESTEROLÊMICAS E O ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO"***. Após a apresentação a candidata foi arguida pela banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado ao projeto de dissertação do candidato. Após julgamento os membros da banca decidiram por:

[X] APROVAR [ ] REPROVAR

Profa. Dra. Silvia Dantas Cangussú
Examinador (a) Externo (a) - (UFOP)

Profa. Dra. Ana Carolina Pinheiro Volp
Examinador (a) Interno (a) - (UFOP)

Prosf. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Orientador (a) - (UFOP)

Profa. Dra. Maisa Silva
Orientador (a) - (UFOP)

Isabel Cristina Mallosto Emerich de Abreu
Mestrando (a) – (UFOP)

Dedico esta dissertação a meu tio, **Álvaro Pio de Abreu Júnior** (*in memoriam*), por me incentivar a crescer profissionalmente buscando a ciência e o conhecimento como pilares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente...

Aos meus professores, orientadores e amigos **Maria Lúcia Pedrosa**, **Maísa Silva**, **Marcelo Eustáquio Silva** e **Wanderson Geraldo de Lima** pela dedicação, carinho, confiança, competência e paciência com que me orientaram na construção dessa dissertação e pelo tempo que generosamente me dedicaram. Sou grata à oportunidade que me deram de trabalhar com vocês, ao aprendizado que me proporcionaram, e principalmente pelo exemplo que levarei durante toda a minha vida profissional;

À **Joyce Guerra** pela amizade e pela enorme contribuição para a idealização deste trabalho;

Ao **Jair Pastor Mota, Clodoaldo Pereira dos Santos e Renata Rebeca Pereira** por sempre tornarem as coisas mais fáceis e pelo apoio constante;

A **todos os professores e colegas dos Laboratórios de Bioquímica Metabólica e Nutrição Experimental** a minha gratidão e a certeza de que, sem vocês, este trabalho não teria sido possível;

Aos **colegas da Pós-graduação** pela agradável convivência;

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição** pelos ensinamentos;

Aos **laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP** por gentilmente cederem o uso dos equipamentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por me guiar, pela graça de chegar até aqui e por que sem Ele nada sou;

Aos meus queridos pais, **César** e **Cristina**, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui, por sempre acreditarem em mim e serem meus exemplos de honestidade, integridade e amor incondicional;

Aos meus maninhos, **Renato** e **Henrique** por se fazerem presentes e alegrarem o meu viver;

Ao **Cézar Maestri Neto** pelo seu companheirismo e por me incentivar a ser melhor do que posso ser;

A todos os **meus familiares** pelo apoio e confiança;

Às amigas **Roberta Nogueira** e **Kely Raspante** por me aturarem e tornarem meus dias ouro-pretanos mais felizes;

Às amigas dos tempos de Viçosa: **Isis Custódio**, **Juliana Leão** e **Lorene Gonçalves** por me incentivarem a fazer este mestrado e por todo apoio que me deram;

Às amigas do **Bloco de Nozes** por se fazerem presentes mesmo à distância, sendo sempre ótimas companhias;

Às amigas **Luluzinhas**, pela agradável companhia e pelas festividades que com tanta alegria comemoramos.

À todos vocês, meu muito obrigada!!!

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado de pacientes sem história de abuso de álcool. É a doença hepática mais comum no mundo ocidental, e sua prevalência está aumentando. A DHGNA é classificada em dois tipos: esteatose, na qual ocorre somente a deposição de gordura nos hepatócitos e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), na qual ocorre, além da esteatose, necroinflamação. A hipótese mais comumente aceita para explicar a progressão da esteatose à EHNA é a hipótese "Two-hit", o primeiro "hit" refere-se aos fatores que podem promover esteatose hepática e o segundo "hit" refere-se aos fatores que podem agravar a esteatose hepática levando à esteato-hepatite. O estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios, é um fator responsável pelo segundo "hit". Elucidar os mecanismos de lesão induzida por estresse oxidativo no fígado é essencial para a compreensão da patogênese da doença. Assim, nossos objetivos foram determinar se a dieta hipercolesterolemiante provoca alterações histológicas no fígado de ratas e verificar se a mesma dieta induz alterações no status antioxidante por meio da expressão de mRNA da NADPH oxidase e das enzimas antioxidantes; da atividade das enzimas catalase, SOD Cu-Zn, glutationa total; e do marcador de peroxidação lipídica (TBARS). Ratas Fischer foram divididas em dois grupos de oito animais de acordo com o tratamento recebido, Controle (C) e Hipercolesterolêmico (H), sendo aquelas do grupo C alimentadas com dieta padrão (AIN-93M) e aquelas do grupo H alimentadas com dieta hipercolesterolemiante (25% de óleo de soja e 1% de colesterol). Ao final de oito semanas, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os dados paramétricos foram avaliados por teste T de *Student* e os não paramétricos por *Mann-Whitney*. A dieta hipercolesterolemiante não alterou o peso corporal, mas resultou em acúmulo de lipídios no fígado, aumentando os níveis séricos das aminotransferases e de colesterol. A expressão de mRNA de subunidades da NADPH oxidase estava aumentada no fígado de animais do grupo H e alterações na atividade e expressão de enzimas antioxidantes e de TBARS foram observadas. Esses resultados sugerem que a dieta hipercolesterolemiante induziu esteatose hepática em ratas, constituindo-se, portanto, em um bom modelo para o estudo de esteatose.

Palavras-chave: Fígado gorduroso; Hipercolesterolemia; NADPH oxidase; Estresse oxidativo; Antioxidantes.

ABSTRACT

The Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a disease characterized by the accumulation of fat in the liver of patients with no history of alcohol abuse. It is the most common liver disease in the Western world, and its prevalence is increasing. NAFLD is classified into two types: steatosis, which occurs only fat deposition in hepatocytes and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which occurs, in addition to steatosis, necroinflamation. The most commonly accepted hypothesis to explain the progression of steatosis to NASH is the hypothesis "Two-hit", the first "hit" refers to factors that may promote hepatic steatosis and the second "hit" refers to factors that can intensify hepatic steatosis leading to steatohepatitis. Oxidative stress, defined as an imbalance between the production of reactive species and the capacity of antioxidant defense systems to neutralize them and prevent their harmful effects, is a factor responsible for the second "hit". Elucidating the mechanisms of injury-induced oxidative stress in the liver is essential for understanding the pathogenesis of the disease. Thus, our aims were to determine whether the hypercholesterolemic diet causes histological changes in the liver of rats and verify if the same diet induces changes in antioxidant status through the mRNA expression of NADPH oxidase and antioxidant enzymes, the activity of catalase, SOD-Cu/Zn, total glutathione, and the marker of lipid peroxidation (TBARS). Fischer rats were divided into two groups of eight animals according to treatment received, control (C) and hypercholesterolemic (H), those in group C were fed with standard diet (AIN-93M) and those of the H group were fed with hypercholesterolemic diet (25% soybean oil and 1% cholesterol). At the end of eight weeks, the animals were anesthetized and euthanized. Parametric data were analyzed by Student's t test and the nonparametric by Mann-Whitney test. The hypercholesterolemic diet did not affect body weight, but resulted in accumulation of lipids in the liver, increased serum levels of aminotranferases and cholesterol. The mRNA expression of subunits of the NADPH oxidase was increased in the liver of animals from group H and alterations in activity and expression of antioxidant enzymes and TBARS were observed. These results suggest that the hypercholesterolemic diet induced hepatic steatosis in rats constituting, therefore, a good model for the study of steatosis.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease; Hepatic steatosis; Hypercholesterolemic diet; NADPH oxidase; Oxidative stress; Antioxidant enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Enzima Acil-Coa sintetase
ACSL1	Enzima Acil-Coa sintetase de cadeia longa
AG	Ácidos graxos
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ASMC	Células musculares lisas de aorta humana
AST	Aspartato aminotransferase
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcóolica
DTNB	Ácido 5,5´ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
H&E	Hematoxilina e eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFABP	Proteína ligadora de ácido graxo do fígado
LXR α	Receptor α do fígado X

MCD	Dieta deficiente em metionina e colina
MDA	Malondialdeído
NOX	NADPH oxidase
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
RI	Resistência à insulina
RVSMC	Células musculares lisas de rato
SOD	Superóxido dismutase
SREBP1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. Introdução/Justificativa..... 13

2. Revisão Bibliográfica..... 16

2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcóolica..... 16

2.2 Modelos para Estudo da Esteatose Hepática..... 19

2.3 Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes..... 21

3. Objetivos..... 27

4. Métodos..... 28

4.1 Animais e Desenho Experimental..... 28

4.2 Dietas..... 28

4.3 Análises Histológicas..... 30

4.4 Avaliação da Glicose, Proteínas Totais, Perfil Lipídico e Indicadores Séricos da Função Hepática..... 30

4.5 Expressão da NADPH Oxidase e das Enzimas Antioxidantes (Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real)..... 31

4.6 Avaliação das Defesas Antioxidantes em Tecido Hepático..... 33

4.7 Biomarcador da Peroxidação Lipídica em Tecido Hepático..... 35

4.8 Proteínas Totais em Tecido..... 36

4.9 Análises Estatísticas..... 37

5. Resultados..... 38

6. Discussão..... 50

7. Conclusão..... 54

8. Referências..... 55

Anexos..... 62

Anexo I. Protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP..... 62

Anexo II. Trabalhos Realizados Durante o Mestrado..... 63

1. Introdução/Justificativa

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado de pacientes sem história de abuso de álcool. A DHGNA é classificada em dois tipos: esteatose, na qual ocorre somente a deposição de gordura nos hepatócitos e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), na qual ocorre, além da esteatose, reações de necroinflamação. A EHNA pode progredir à cirrose hepática e se complicar por carcinoma hepatocelular (TAKAHASHI *et al*., 2011).

A DHGNA é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica com prevalência de 15 a 20% na população em geral (ANGULO, 2002), estima-se que acometa aproximadamente 30 milhões de americanos (HANSMANN *et al*., 2013). Em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 a incidência de esteatose está próxima a 50% e aumenta para 76-90% na população obesa (PETTINELLI *et al*., 2011). Cerca de 10-15% dos pacientes com DHGNA desenvolvem EHNA e 15-25% dos pacientes com EHNA progridem para cirrose (BRUNT; TINIAKOS, 2010).

A teoria “Two hit" é adotada para explicar a progressão da DHGNA à EHNA. Nesta teoria, o primeiro “hit” consiste no acúmulo de ácidos graxos/ triacilgliceróis no fígado, enquanto que o segundo “hit” envolve o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, e inflamação, o que acaba por causar danos ao fígado. É também evidente que citocinas inflamatórias e resistência à insulina estão estreitamente associadas à esteatose hepática durante a progressão da DHGNA (ENJOJI *et al*., 2012).

O estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las e prevenir seus efeitos deletérios (SIES, 1986), tem implicações negativas nas células promovendo alterações nos componentes celulares. Um dos sítios fisiológicos de geração de espécies reativas no corpo humano é a NADPH oxidase (LEVIN *et al*., 2012; PAIK; BRENNER, 2011). A NADPH oxidase é um complexo enzimático que catalisa a produção de superóxido, que, por sua vez serve como o ponto de partida para a produção de uma variedade de reagentes oxidantes, incluindo os halogênios, os radicais livres e oxigênio singlete (BABIOR, 1999).

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase e glutationa redutase, entre outras. Os antioxidantes não enzimáticos

incluem ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol (vitamina E), tióis, bilirrubina, glutationa, carotenóides e flavonóides (MARITIM *et al.*, 2003).

Foram desenvolvidos alguns projetos de pesquisa com dieta hipercolesterolemiante em nossos laboratórios e já era sabido que essa dieta causava danos ao fígado, no entanto, nenhum trabalho caracterizou o modelo para estudo da esteatose hepática e também nenhum deles avaliou o envolvimento do estresse oxidativo na esteatose.

Um dos primeiros trabalhos publicados foi o de Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) que investigaram a sobrecarga de ferro em ratas tratados com dieta hipercolesterolêmica durante oito semanas e encontraram que os animais do grupo hipercolesterolêmico apresentaram colesterol total aumentado e triglicerídeos reduzidos quando comparados ao grupo controle. A dieta hipercolesterolêmica aumentou a atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT), indicando lesão hepática.

Posteriormente, Matos *et al.* (2005) avaliaram o efeito de dietas experimentais hipercolesterolêmicas com diferentes conteúdos de óleo de soja, amido, caseína, micronutrientes e fibra em ratas durante oito semanas. Os melhores resultados, ou seja, a dieta que foi capaz de promover hipercolesterolemia nas ratas sem afetar seu desenvolvimento foi a dieta composta por 25% de óleo de soja e 1% de colesterol. Essa dieta promoveu aumento do LDL, uma redução do HDL e alterou menos a função hepática dos animais, mas ainda sim se observou alteração nas aminotransferases.

Silva *et al.* (2008) em seu trabalho com ratos no qual avaliou o efeito do excesso de ferro associado à dieta hipercolesterolemiante sobre o perfil de lipídios, perfil glicêmico e estresse durante 16 semanas, encontrou que essa dieta aumentou o colesterol total, diminuiu o colesterol HDL e aumentou a porcentagem de gordura no fígado de animais do grupo hipercolesterolêmico se comparado ao grupo controle. Ainda, os cortes histológicos corados pela H&E dos fígados dos ratos que receberam tratamento com a dieta hipercolesterolemiante apresentaram-se com esteatose microvesicular e macrovesicular intensa, inflamação perivascular e parenquimal moderada. Nas lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson foi verificado neoformação de colágeno.

Souza *et al.* (2010) em seu estudo investigaram os potenciais efeitos antioxidante e hipocolesterolêmico da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart.) em ratas alimentadas com dieta padrão e hipercolesterolemiante. Os animais que receberam dieta hipercolesterolemiante apresentaram injúrias hepáticas caracterizadas por hepatomegalia e aumento de aspartato

aminostransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP); aumento dos níveis séricos de colesterol e um aumento significante da atividade da SOD.

Atualmente, não há nenhum tratamento eficaz para a esteatose. Modificações de estilo de vida, semelhantes aos recomendados para a obesidade, permanecem a melhor opção terapêutica. O conhecimento dos mecanismos celular e molecular que levam a esteatose hepática é essencial para a compreensão da patogênese e desenvolvimento de tratamentos mais adequados (FERRÉ; FOUFELLE, 2010).

Assim, se faz necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizam alterações metabólicas presentes na doença humana. No presente trabalho foi utilizado o modelo experimental de indução de hipercolesterolemia (TURBINO-RIBEIRO *et al.,* 2003; MATOS *et al.*, 2005; SOUZA *et al.,* 2010) para caracterizar alterações histológicas no fígado de ratas e verificar se a mesma dieta induz alterações no status oxidante/antioxidante por meio da expressão de mRNA da NADPH oxidase e das enzimas antioxidantes; da atividade das enzimas catalase, SOD-Cu/Zn, glutationa total e do marcador de peroxidação lipídica.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Doença Hepática Gordurosa Não-Alcóolica (DHGNA)

A DHGNA se refere a um amplo espectro de danos ao fígado, variando de esteatose a esteato-hepatite, fibrose avançada e cirrose (NAGATA *et al.*, 2007). O quadro patológico se assemelha ao da lesão hepática induzida pelo álcool, no entanto, ocorre em indivíduos que não têm ingestão etílica significativa (CARVALHEIRA; SAAD, 2006; NAGATA *et al.*, 2007).

A prevalência mundial de DHGNA não foi ainda determinada, mas estima-se que seja de 10–24% em várias populações, e talvez essa doença seja a principal causa de morbidade e mortalidade de doenças do fígado, com potencial para progredir para insuficiência hepática. A progressão para fibrose ou cirrose parece ocorrer somente em pacientes com evidência de esteato-hepatite. A DHGNA é a causa de elevação assintomática de aminotransferases em 45–90% dos casos, excluídas outras causas bem estabelecidas (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

Diferentes agentes e condições patológicas estão associadas com DHGNA, dentre as quais resistência à insulina, erros inatos do metabolismo, condições médicas ou cirúrgicas associadas à perda de peso, e algumas drogas e toxinas. Parece que a DHGNA, o diabetes *mellitus* tipo 2 e a dislipidemia compartilham mecanismos patogênicos, o que significa que muitos pacientes com DHGNA tem múltiplos componentes da síndrome metabólica e que a resistência à insulina é um importante fator preditor de DHGNA e EHNA (CARVALHEIRA; SAAD, 2006; PETTINELLI *et al.*, 2011).

A esteatose hepática pode se manifestar de duas formas: microvesicular e, ou macrovesicular. A esteatose microvesicular é geralmente associada com disfunção hepática grave a qual está relacionada com alterações na via de beta-oxidação dos ácidos graxos livres, ocorrendo frequentemente de forma aguda na gestação e na síndrome de Reye's. Já a esteatose macrovesicular é resultante de alterações fisiopatológicas crônicas, envolvendo aumento da síntese, oxidação deficiente e redução da secreção hepática de lipídios e ocorre na obesidade, doença hepática alcoólica, caquexia, distúrbios metabólicos, hepatite C, resistência à insulina e diabetes (MAZZA *et al.*, 2005).

Em indivíduos adultos, características histopatológicas da DHGNA foram integralmente descritas e incluem esteatose macrovesicular, inflamação lobular, balonamento

hepatocelular, fibrose perisinusoidal, corpúsculo hialino de Mallory e glicogênio nuclear. Uma vez que a esteatose macrovesicular combinada com mudanças do balonamento dos hepatócitos e, ou fibrose perisinusoidal estejam presentes tem-se o diagnóstico de EHNA (TAKAHASHI *et al*., 2011).

Embora o mecanismo exato que leva a progressão da DHGNA a EHNA permaneça desconhecido, uma grande quantidade de informações sobre os mecanismos de infiltração de gordura, dano, inflamação e fibrose em EHNA tem sido reportado (AI *et al*., 2011). A hipótese mais comumente aceita para explicar essa progressão é a hipótese "Two-hit", o primeiro "hit" refere-se aos fatores que podem promover esteatose hepática e o segundo "hit" refere-se aos fatores que podem agravar a esteatose hepática levando à esteato-hepatite (FUKUNISHI *et al.,* 2009).

Nos estágios iniciais da DHGNA, a gordura acumula-se dentro dos hepatócitos quando os mecanismos que promovem a remoção dos lipídeos (por oxidação ou exportação) não acompanham os mecanismos que promovem a importação ou a biossíntese desse macronutriente (FERRÉ; FOUFELLE, 2010; VARELA-REY *et al.*, 2009).

Entre os fatores mais bem caracterizados relacionados à evolução da DHGNA à EHNA estão os ácidos graxos (AG), o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e a adiponectina. Os AG rotineiramente se deslocam entre o fígado e o tecido adiposo, sendo estes órgãos fontes de TNF-α e adiponectina, respectivamente. A adiponectina reduz o acúmulo de lipídios dentro dos hepatócitos por inibir a importação e diminuir a oxidação e a exportação de ácidos graxos, sendo também um potente agente sensibilizador à insulina. O TNF-α antagoniza as ações da adiponectina e promove esteatose do hepatócito e a resistência à insulina (RI). Dessa forma, situações em que há produção aumentada de TNF-α em relação à adiponectina promovem esteatose hepática e RI. Ainda, o TNF-α aumenta a geração mitocondrial de espécies reativas do oxigênio, as quais têm sido mostradas como indutoras da RI, também promove apoptose dos hepatócitos e o recrutamento de células inflamatórias para o fígado. O simples acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos induz a uma sinalização para ativação de quinases que por sua vez ativam o fator de transcrição nuclear NFκB, que induz a síntese de TNF-α e interleucina-6 pelos hepatócitos, contribuindo, assim, para a RI sistêmica (DIEHL, 2009).

Segundo Alkhouri *et al.* (2011) estudos de seu laboratório mostraram que pacientes com EHNA possuem altos níveis de ácidos graxos oxidados e citocinas inflamatórias quando comparados com pacientes com esteatose.

Dessa forma, o primeiro "hit" é, então, atribuído à RI que promove o acúmulo de lipídios nos hepatócitos (FUJITA *et al*., 2011), principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG), sendo, portanto, a condição necessária para o desenvolvimento de EHNA (AI *et al*., 2011; JANSEN, 2004).

Ai *et al*. (2011) encontraram em seu trabalho que dieta rica em gordura (banha 10% e colesterina 2%) estimula a expressão o receptor α do fígado X (LXRα) que, por sua vez, estimula expressão da proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP1c), aumentando a atividade da ácido graxo sintase. Parece que, quando a síntese de ácidos graxos livres suplanta os mecanismos responsáveis por seu catabolismo, os TAG excedentes são acumulados no fígado contribuindo para a esteatose e o processo inflamatório e, eventualmente, resultando em EHNA.

De acordo com Krammer *et al*. (2011) a captação de ácidos graxos de cadeia longa em células de hepatoma pode ser regulada pelos níveis de expressão de enzimas intracelulares. Estes autores propõem que a enzima acil-Coa sintetase (ACS) direciona a captação de ácido graxo indiretamente por esterificação e, portanto, as proteínas transportadoras de ácido graxo (FATP2, FATP4), a ACS de cadeia longa (ACSL1) e a molécula CD36 (uma translocase de ácido graxo) são alvos em potencial para o tratamento da DHGNA ou EHNA.

As investigações de Janevski *et al*. (2011) indicam que a proteína ligadora de ácidos graxos no fígado (LFABP) pode desempenhar um papel fundamental no estabelecimento de DHGNA e EHNA induzida por dieta deficiente em metionina e colina (MCD) não só pelo aprisionamento de ácidos graxos de cadeia longa no interior da célula, mas possivelmente também atuando como um antioxidante. Além disso, a diminuição dos níveis de LFABP no modelo de MCD para indução de EHNA pode sugerir comprometimento no funcionamento do LFABP nesta doença. O regime C2 (52 dias de MCD e um adicional de 56 dias de MCD com suplementação de cacau) aumentou simultaneamente a esteatose, inflamação portal e fibrose, sugerindo um possível papel para NADPH oxidase (NOX) na inflamação e fibrose no fígado de ratos com EHNA.

Injúrias celulares como estresse oxidativo, toxicidade direta pelo acúmulo de lipídios, disfunção mitocondrial e, ou endotoxinas bacterianas provenientes do intestino causam inflamação hepática e se constituem em fatores responsáveis pelo segundo "hit" no estabelecimento da EHNA (FUJITA *et al*., 2011). Tais injúrias resultam em profundas mudanças na expressão dos genes levando, em última instância, à apoptose e contribuindo para o processo inflamatório (MARRA *et al.*, 2008).

As espécies reativas de oxigênio podem provocar esteato-hepatite por peroxidação lipídica, indução de citosinas ou indução de fas-ligante (DIEHL, 2009). Além disso, a atividade da enzima citocromo P450 Cyp2E1 parece ser também um gatilho importante para a progressão da doença e fibrogênese (CARVALHEIRA; SAAD, 2006).

Os mecanismos associados com o acúmulo de TAG no fígado e os subseqüentes danos hepatocelulares são multifatoriais e, embora existam alguns estudos sobre esse tema, ainda não são totalmente compreendidos.

2.2 Modelos para Estudo da Esteatose Hepática

O estudo de modelos animais existentes forneceram "insights" essenciais para compreender a patogênese da esteatose e da esteato-hepatite, mas estas ainda permanecem incompletamente compreendidas (ANSTEE; GOLDIN, 2006; KOTEISH; MAE, 2002).

A literatura contém muitos diferentes modelos de roedores que apresentam evidência histológica de esteatose hepática. As características da verdadeira esteato-hepatite deveriam incluir a degeneração por balonamento dos hepatócitos além da simples deposição de gordura e da presença de infiltrado inflamatório (ANSTEE; GOLDIN, 2006; KLEINER *et al*., 2005).

Nenhum modelo existente exibe o fenótipo completo da DHGNA como encontrada na prática clínica, e muitos diferem da doença humana, no entanto, assemelham-se histologicamente. Essas inconsistências e a falta de um modelo fiável de esteato-hepatite fibrosante progressiva têm dificultado a investigação neste campo (ANSTEE; GOLDIN, 2006).

Os modelos animais para estudo de DHGNA podem ser divididos em duas grandes categorias: as causadas por mutações genéticas e as por fenótipo adquirido produzido por manipulação dietética ou farmacológica. A literatura contém muitos diferentes modelos de camundongos que apresentam evidência histológica de esteatose hepática, ou, mais

variavelmente esteato-hepatite, no entanto, poucos replicam o fenótipo humano por completo. Os camundongos geneticamente deficientes em leptina (ob/ob) ou resistentes à leptina (db/db) e o modelo de deficiência metionina/colina são usados na maioria dos trabalhos publicados. Uma vez que é altamente improvável que a DHGNA na população humana seja monogênica, o estudo de animais com supressão ou super-expressão de um único gene pode não imitar a etiologia da doença humana a nível molecular. Também, a interrupção de genes alvo e o uso de dietas supra-nutricionais para induzir DHGNA ganharam destaque. Da mesma forma, escolher uma dieta experimental pode não imitar as dietas humanas associadas ao desenvolvimento de DHGNA no homem (ANSTEE; GOLDIN, 2006; NAGARAJAN *et al*., 2012).

Os diferentes modelos animais estudados até agora nos deram inestimável informação de alguns dos mecanismos envolvidos na progressão da DHGNA e ajudaram a identificar alvos terapêuticos. Contudo, é necessário o desenvolvimento de modelos animais que se encaixam de forma mais precisa às alterações metabólicas da DHGNA em humanos (VARELA-REY *et al*., 2009).

Ikuta e colaboradores (2012) obtiveram desenvolvimento de esteatose severa em ratos espontaneamente hipertensos induzida por dieta deficiente em colina. Lieber e colaboradores (2004) induziram esteato-hepatite em ratos utilizando dieta líquida com 71% da energia derivada de gordura por três semanas quando a dieta foi administrada *ad libitum.* Sabe-se que na hipercolesterolemia o conteúdo de colesterol é elevado no soro, bem como em eritrócitos, plaquetas e células endoteliais. Esse aumento de colesterol é descrito como o responsável por ativar essas células e causar um aumento na produção de radicais livres (KAMESH; SUMATHI, 2012). Considerando o exposto acima e os trabalhos desenvolvidos em nossos laboratórios (TURBINO-RIBEIRO *et al.*, 2003; MATOS *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2010), é plausível avaliar se um modelo animal de hipercolesterolemia pode ser também utilizado para o estudo da DHGNA.

2.3 Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes

A associação do estresse oxidativo a DHGNA tem aumentado a gama de estudos a esse respeito e para tal faz-se necessário a compreensão dos danos oxidativos induzidos pelos radicais livres e dos mecanismos de defesas antioxidantes.

Radical livre é um átomo ou molécula que possui elétrons desemparelhados e, por essa razão, é instável e apresenta grande reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2008). Os radicais livres formados no organismo humano são derivados de oxigênio e nitrogênio e estes radicais podem servir para a formação de outras espécies químicas que embora não tenham elétrons desemparelhados, apresentam instabilidade estrutural que atribui a essas espécies reatividade similar à dos radicais livres. Por essa razão, espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são o termo mais apropriado para designar espécies reativas na forma de radical livre ou não-radical (RIBEIRO *et al*., 2008). Assim, as ERO abrangem os radicais de oxigênio como radical hidroxil (•OH) e radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e os não-radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1O_2$)[2] (BERRA *et al.*, 2006). Já as ERN incluem o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO−) (BARREIROS *et al*., 2006).

Os principais sítios fisiológicos de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) no organismo humano são: cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, metabolismo de ácidos graxos no peroxissoma, via metabólica catalisada pelas enzimas citocromo P_{450} nos microssomas, via da NADPH oxidase nas células fagocíticas, via de síntese das prostaglandinas (RIBEIRO *et al.*, 2008). Ainda, alguns sistemas enzimáticos produzem ERON tais como ciclooxigenase, lipoxigenase, xantina oxidase, mieloperoxidase, óxido nítrico sintase (RABÊLO *et al.*, 2010).

As NADPH oxidases são um grupo de enzimas associadas à membrana plasmática encontradas em uma variedade de células de origem mesodérmica. Esse complexo enzimático catalisa a produção de superóxido pela reação de redução na qual um elétron é doado ao oxigênio, usando NADPH como doador de elétrons. O ânion superóxido gerado por esta enzima serve como o ponto de partida para a produção de uma grande variedade de reativos oxidantes, incluindo halogênios, radicais livres e oxigênio singlete (BABIOR, 1999).

No fígado, a NADPH oxidase é funcionalmente expressa tanto na forma fagocítica quanto na forma não-fagocítica (PAIK; BRENNER, 2011).

A NADPH de fagócitos é uma proteína multimérica constituída por: subunidades reguladoras ($p47^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$ e $p40^{PHOX}$) e uma pequena GTPase localizada no citoplasma (proteínas RAC), dois componentes de membrana associada $gp91^{PHOX}$ (subunidade catalítica) e $p22^{PHOX}$ (subunidade reguladora) localizados nas membranas das vesículas secretoras e grânulos específicos, onde ocorrem como uma flavohemoproteina heterodimérica conhecida como citocromo b558 (BABIOR, 1999; JONES *et al.*, 2000; LEVIN *et al.*, 2012). A ativação do complexo enzimático ocorre quando a subunidade $p47^{PHOX}$ citoplasmática é fosforilada (serina), provocando a sua translocação para a membrana, onde, juntamente com a RAC2, associa-se com o citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (BABIOR, 1999; PAIK; BRENNER, 2011). Os reativos oxidantes gerados pela atividade da NADPH oxidase são usados pelos fagócitos para matar microorganismos invasores, mas também causam muitos "danos colaterais" aos tecidos adjacentes, assim, a produção deve ser bem regulada para se certificar de que eles serão gerados quando e onde necessário (BABIOR, 1999).

A NADPH oxidase não-fagocítica é estrutural e funcionalmente semelhante à forma de fagócitos. No entanto, a primeira é constitutivamente ativa, produzindo níveis relativamente baixos de ERO em condições basais e induzindo a geração de níveis mais elevados de oxidantes em resposta a diferentes estímulos (DE MINICIS *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2000; LEVIN *et al.*, 2012).

A identificação de subunidades homólogas à gp91phox resultou na formação da família Nox (de "nonphagocytic NADPH oxidase"), constituída atualmente por sete membros (Nox1, Nox2 [formalmente conhecida como $gp91^{PHOX}$], Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 [Dual oxidase]). O homólogo da $gp91^{PHOX}$, Nox1, é expresso em células musculares lisas de rato (RVSMC) e camundongo e células musculares lisas de aorta humana (ASMC), não aparecendo em artérias de resistência de humanos. A Nox1 possui 56% de homologia com a gp91 humana e, em conjunto com a $p22^{PHOX}$, é o provável componente funcional do citrocromo b558 em ASMCs e RVSMC. Há também evidências de que a NADPH oxidase é encontrada no núcleo celular, envolvendo-se na expressão gênica. Vários grupos identificaram subunidades de NADPH oxidase em membranas internas. Entretanto, as consequências da ativação da NADPH oxidase em regiões perinucleares ainda não são claras (RABÊLO *et al.*, 2010).

As NADPH oxidases são ativadas e reguladas por diversos fatores, como forças mecânicas, hormônios e citocinas, dentre os quais se destacam a trombina, o fator de crescimento derivado de plaqueta, o TNF-α, a lactosilceramida, a interleucina-1, a LDL oxidada (RABÊLO *et al.,* 2010). São inibidas por 4-hidroxinonenal (bloqueador de sulfidrilas natural), nitrosotióis (RSNO), PR-39 (um peptídio antimicrobiano de neutrófilos) e óxido nítrico que impede a montagem durante a ativação dessa enzima (BABIOR, 1999).

Durante o desbalanço redox há um aumento na atividade da NADPH oxidase e predomínio de agentes pró-oxidantes, superando a capacidade de defesa orgânica antioxidante. As sutis diferenças existentes entre as unidades estruturais das NADPH oxidases, podem ter implicações terapêuticas, permitindo a inibição seletiva do desequilíbrio redox induzido pela NADPH oxidase, sem comprometer, entretanto, sua participação nas vias fisiológicas de sinalização celular que por sua vez garantem a proteção contra microorganismos (RABÊLO *et al.,* 2010).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo humano e, assim, as ERON são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS *et al.*, 2006). Se há desequilíbrio entre a formação de ERO e a atuação das defesas antioxidantes, em consequência do aumento da produção de radicais livres ou da diminuição das defesas, instala-se o estresse oxidativo (RIBEIRO *et al*., 2008). Os principais alvos de ERO incluem DNA, lipídeos, proteínas e açúcares. A ordem de preferência ao ataque é influenciada por muitos fatores, dentre os quais, o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (BARREIROS *et al*., 2006; BERRA *et al*., 2006). Dessa maneira, o estresse oxidativo causa alterações na estrutura e integridade funcional da célula e pode induzir respostas imunes, que culminam com mecanismos inflamatórios crônicos ou ainda, sinalizam uma resposta de proliferação celular fora do controle (RIBEIRO *et al*., 2008).

Assim, para evitar que o estresse oxidativo se instale, as defesas antioxidantes devem estar atuando eficazmente. De acordo com Halliwell (2000) "*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*". Atualmente, distinguem-se três classes de antioxidantes de acordo com a sua funcionalidade, sendo elas: antioxidantes preventivos, os quais suprimem a formação de radical livre; antioxidantes que

eliminam os radicais livres inibindo a sua reatividade e antioxidantes envolvidos no processo de reparo (RIBEIRO *et al.*, 2008).

As proteções conhecidas do organismo contra as ERON abrangem a proteção enzimática ou por moléculas de baixo peso molecular, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas por meio da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da glutationa peroxidase (GPx), catalase e superóxido dismutase (SOD) ou, não enzimaticamente, a exemplo da glutationa reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligantes de ferro (transferrina, ferritina, metalotioneínas e haptoglobinas) (BARREIROS *et al*., 2006; BERRA *et al*., 2006), ácido diidrolipóico e ubiquinona reduzida (ubiquinol-$CoQH_2$). Já os exemplos de antioxidantes provenientes da dieta são o α-tocoferol (vitamina-E), β-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS *et al*., 2006).

A glutationa reduzida (GSH, L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais encontrado no meio intracelular. Sua capacidade redutora é atribuída ao seu grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta, além de atuar diretamente na síntese de proteínas, DNA, prostaglandinas e no metabolismo celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; JÚNIOR *et al*., 2001). Atua ainda, como transportadora e reservatório de cisteína, participa da detoxificação de agentes químicos, da eliminação de produtos da lipoperoxidação (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Posteriormente à exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a glutationa oxidada (GSSG). A regeneração da GSH é feita pela enzima glutationa redutase (GSH-Rd), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular uma vez que impede a paralização do ciclo metabólico da glutationa. A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, por conseguinte, também dependente da integridade da via das pentoses. No jejum e na deficiência de glicose 6-fostato desidrogenase ou em qualquer condição em que também haja redução do fornecimento de NADPH, há prejuízo da função da GSH-Rd (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; JÚNIOR *et al*., 2001).

Quando ocorre inativação de um agente oxidante há produção de GSSG e depleção de GSH e em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Entretanto, em situações em que ocorre excesso de agentes oxidantes e, ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Destarte, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

A GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à medida que catalisa a redução deste e de peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG. Ainda que a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, foi demonstrado que *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). A enzima GPx apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima. Dessa forma, o selênio deve ser mantido em concentrações normais no organismo para que não implique na diminuição da atividade dessa enzima (JÚNIOR *et al*., 2001).

A catalase é uma hemeproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (DREVET, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: a forma SOD-cobre-zinco que está presente primariamente no citosol e a SOD-manganês que está principalmente localizada na mitocôndria. Esta enzima tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2, na presença do próton H^+ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MATÉS, 2000).

Alguns dos mecanismos de ataque de ERO e os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos podem ser visualizados na Figura 1.

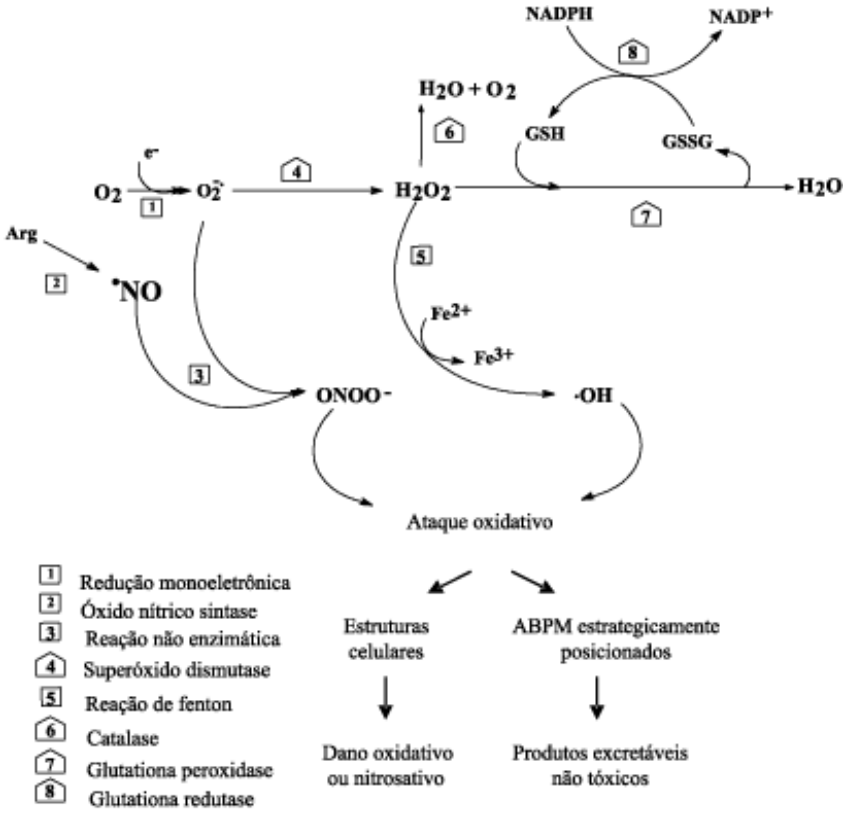

***Figura 1**. Mecanismos de ataque de EROs, partindo da redução monoeletrônica do O_2 e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo □ refere-se a mecanismos de produção de EROs e o símbolo ⬠, às principais enzimas da defesa antioxidante*

ABPM refere-se à antioxidantes de baixo peso molecular

Fonte: GANDRA *et al*., 2004

Com respeito aos antioxidantes provenientes da dieta, de modo geral, os polifenóis e em particular os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres (BARREIROS *et al*., 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar histologicamente a esteatose hepática e avaliar o envolvimento do estresse oxidativo em ratas alimentadas com dieta hipercolesterolemiante.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar histologicamente a esteatose hepática em ratas hipercolesterolêmicas;
- Verificar alterações na expressão da NADPH oxidase;
- Analisar as atividades das enzimas antioxidantes e possíveis alterações na expressão gênica das mesmas;
- Avaliar danos oxidativos provocados pela dieta hipercolesterolemiante.

4. Métodos

4.1 Animais e Desenho Experimental

Foram utilizadas ratas Fisher com oito semanas de idade, pesando aproximadamente 138 g provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Durante a realização dos experimentos, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas mantidos em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade e ventilação, e receberam água e dieta *ad libitum*, sendo as dietas específicas para cada grupo experimental. Dezesseis ratas foram divididas em dois grupos, de acordo com o tratamento recebido, Controle (C) e Hipercolesterolêmico (H), de forma que foram separados oito animais para cada grupo. Os animais foram divididos nos respectivos grupos de acordo com o peso corporal de forma que não houvesse diferenças estatísticas entre os grupos. O período experimental teve duração de oito semanas, totalizando 56 dias. Ao fim do experimento, os animais foram deixados doze horas em jejum e anestesiados com isofluorano. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno sem anticoagulante por meio da incisão arterial braquial até sangria total. Posteriormente, o sangue foi centrifugado à 10000 g por 10 minutos, o soro retirado e armazenado à -80 °C para a realização das dosagens séricas. O fígado, a gordura abdominal e mesentérica foram extraídos e posteriormente pesados. O fígado foi fragmentado para realização das dosagens e mantido à -80 °C e o menor lobo foi coletado para análise histopatológica, sendo conservado em formol tamponado. O protocolo experimental relativo ao uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto, certificado CEUA protocolo nº 2012/17.

4.2 Dietas

Os animais do grupo C foram alimentados com dieta padrão AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993) e aqueles do grupo H com dieta hipercolesterolemiante (25% de óleo de soja e 1% de colesterol) conforme descrito na tabela 1.

As dietas padrão e hipercolesterolemiante foram preparadas a cada três semanas no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro

Preto. Acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a 4 °C. A seguir, a composição das dietas experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg de dieta)

Nutrientes	Padrão	Hipercolesterolemiante
Colina	2,5	2,5
Mix Vitaminas[1]	10,0	10,0
Mix Minerais[2]	35,0	35,0
Celulose	50,0	50,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de Soja*	40,0	250,0
Caseína	140,0	140,0
Amido de milho	622,5	402,5
Colesterol	0,0	10,0
Valor calórico (Kcal /kg)	3810	4820

[1]**Mistura de vitaminas** (expresso em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido *p*-amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; biotina – 40; cianocobalamina – 3; *dl*-α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000.

[2]**Mistura de minerais** (expresso em g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / $MgSO_4$.7H2O- 57,3 / $CaCO_3$-381,4 / $MnSO_4.H_2O$ – 4,01 / $FeSO_4.7H_2O$ – 0,548 / $CuSO_4$. 5H2O – 0,477 / $CoCl_2.6H_2O$ – 0,023 / KH_2PO_4 – 389,0.

* O óleo de soja contém, em 100g, 18g de gordura saturadas e 82 g de gordura insaturada das quais 21g de ácido oleico, 55g de ácido linoleico e 6g de ácido linolênico.

Fatores de conversão: proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g, açúcares 4 kcal/g.

A eficiência alimentar foi calculada de acordo com a fórmula: ganho de peso x ingestão $^{-1}$.

4.3 Análises Histológicas

O menor lobo do fígado das ratas foi removido ao fim do experimento e fixado em formol tamponado a 4%. Posteriormente, os lobos fixados foram cortados transversalmente e processados em série decrescente de álcoois e embebidos em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro μm foram obtidos em micrótomo semi-automático, montadas e coradas pelas técnicas Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital. As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do *Software Image J*. O acúmulo de lipídeos e a contagem dos hepatócitos que continham esteatose macrovesicular foram quantificados em área total de $1{,}5x10^6$ μ^2 usando secções parafinadas coradas com H&E. A presença ou ausência de fibrose foi avaliada através de secções parafinadas coradas com tricrômico de Masson na mesma área total de tecido. Para a coloração de Sudan IV, utilizaram-se fragmentos de tecido hepático fixado em formol tamponado, que foi congelado, cortado em criostato e imerso em álcool 70%. Em seguida, os cortes foram corados, montados em lâmina e foram obtidas fotomicrografias como descrito anteriormente. Esta coloração permite a confirmação da presença de lipídios no tecido, uma vez que estes são pigmentados com a cor vermelha.

4.4 Avaliação da Glicose, Proteínas Totais, Perfil Lipídico e Indicadores Séricos da Função Hepática

O soro armazenado à -80 ºC após o fim do experimento foi utilizado para a realização dessas dosagens.

A avaliação da glicose, das proteínas totais, da alanina aminotrasferase (ALT) e da aspartato aminotrasferase (AST) foram realizadas por meio de técnica colorimétrica com a utilização de Kits Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil), sendo o procedimento realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Para avaliação do perfil lipídico, os TAG e o colesterol total foram determinados por métodos enzimáticos, utilizando-se também Kits Labtest. Depois da precipitação de LDL e VLDL com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, o colesterol HDL presente no sobrenadante foi mensurado por meio do mesmo kit utilizado para determinar o colesterol total.

4.5 Expressão da NADPH Oxidase e das Enzimas Antioxidantes (Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real)

4.5.1. Extração do RNA Total

O RNA total do tecido hepático das ratas foi isolado utilizando o sistema SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.2. Síntese do cDNA

O ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA total utilizando o kit Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems, (Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 μL de tampão 10x (500 mM de KCl, 100 mM deTris-HCl, 25 mM de $MgCl_2$, pH 8,3), 0,8 μL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 2 μL de primers randômicos e 1 μL da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/μL). A reação foi realizada nas seguintes condições, 10 minutos a 25 °C, seguido de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C no termociclador Biocycler modelo MJ96+.

4.5.3. Primers

Os primers utilizados para a amplificação dos genes transcritos de interesse relacionados às subunidades da NADPH oxidase foram $gp91^{PHOX}$, $p22^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$, $p40^{PHOX}$, $p67^{PHOX}$. Os primers para avaliação das defesas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase-Cu/Zn (SOD-Cu/Zn), glutationa peroxidase (GPx), gamma-glutamilcisteína sintetase (γ-GCS) foram desenhados conforme uma sequência de nucleotídeos já publicada (XIONG *et al*., 2010). O primer para gene de controle endógeno utilizado foi o 18S. Cabe ressaltar que todos os primers utilizados foram previamente testados em outros trabalhos do laboratório (GUERRA *et al*., 2011; ROSSONI-JÚNIOR *et al*., 2012).

4.5.4. RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, com um volume final de reação de 12 μL, foram pipetados 1 μL de cDNA (100 ng), 0,5 μL de cada primer (forward e reverse, 10 μM), 6 μL de SYBR® Green Master Mix, o volume final foi ajustado com água livre de DNAse. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e então 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (anelamento dos primers e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa 7000 System SDS Software (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (CT comparativo ou ΔΔCT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene controle endógeno 18S e uma amostra calibradora (grupo C) foi utilizada como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de CT (threshold cycle), que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial do PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔCT de cada amostra, de acordo com a equação 1, na qual o valor do CT do gene controle endógeno (18S) foi subtraído do CT do gene alvo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ do gene alvo} - C_T \text{ do gene controle endógeno} \quad (1)$$

Em seguida foram calculados os valores de ΔΔCT, de acordo com a equação 2, na qual o valor do ΔCT da amostra calibradora (grupo C) foi subtraído do ΔCT das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ da amostra teste} - \Delta C_T \text{ da amostra calibradora} \quad (2)$$

Os valores do ΔΔCT obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.6 Avaliação das Defesas Antioxidantes em Tecido Hepático

4.6.1 Catalase

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi (1984). O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 3 min por espectrofotometria a 240 nm. Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4 ºC. O sobrenadante retirado foi usado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foi colocado 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho maria a 30 ºC por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL da amostra e a reação iniciada pela adição de 900 µL de H_2O_2 (10 mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer (equação 3).

$$A = \varepsilon bc \quad (3)$$

Onde;

A é a absorbância,

ε é o coeficiente de extinção molar em unidades de $mol^{-1}cm^{-1}$

b é caminho óptico,

c é a concentração da enzima expresssa em mol L^{-1}

A absorbância a ser utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Será utilizado o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio (39,4 $M^{-1}cm^{-1}$).

Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μmol de H_2O_2 por minuto.

4.6.2 Superóxido Dismutase

A atividade da SOD foi avaliada por meio do kit Superoxide Dismutase Assay Kit adquirido pela Cayman Chemical Company (nº 706002). Este teste utiliza o sal de tetrazólio para detectar a geração de radicais superóxido pela xantina oxidase e hipoxantina. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para exibir 50% de dismutação do radical superóxido. Somente a SOD-Cu/Zn foi mensurada. Abaixo segue um esquema do teste (Figura 2).

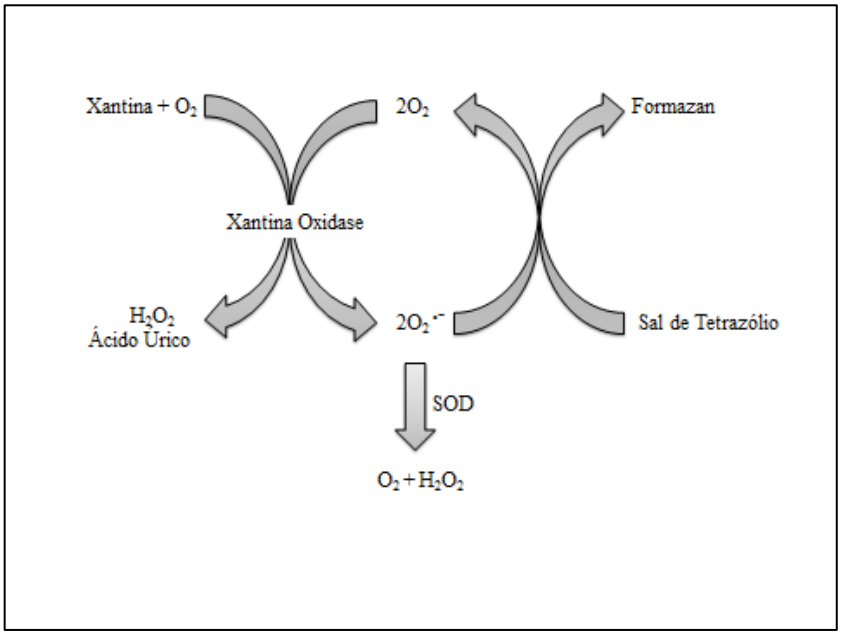

Figura 2. Esquema do kit de Superóxido Dismutase.

4.6.3 Glutationa Total

Este ensaio consiste em uma adaptação do kit da Sigma (Glutathione Assay Kit) o qual utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB (ácido 5,5´ditio-bis (2-nitrobenzóico)) a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm conforme descrito nas reações abaixo:

1) $2GSH + DTNB \rightarrow GSSG + 2TNB$

2) $GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{Glutationa redutase}} 2GSH + NADP^+$

A combinação das duas reações:

$$DTNB + H^+ + NADPH \xrightarrow[GSSG/GSH]{\text{Glutationa redutase}} 2TNB + NADP^+$$

Para o procedimento experimental, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de ácido sulfosalicílico 5%, e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Em uma microplaca foram adicionados 10 µL da amostra, em seguida, 150 µL da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 µM de NADPH, 0,031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/mL de glutationa redutase, e 0,24% de ácido sulfosalicílico. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH 0,16 mg/mL foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutationa reduzida foram determinadas conforme descrito anteriormente, para obtenção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutationa total em 10 µL de amostra, e este valor convertido para 1 mL de amostra.

4.7 Biomarcador da Peroxidação Lipídica em Tecido Hepático (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de Buege e Aust (1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a

lipídeos oxidados. Resumidamente, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida centrifugado por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Dessa forma, 500 μL do sobrenadante do homogenato foram misturados com TCA (28% p/v em HCl 0,25 M), TBA (1% em ácido acético 0,25 M) e BHT (125 mM em etanol), aquecido por 15 min a 95 °C e imediatamente a seguir colocado em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 10000 g por 15 minutos a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante determinada a 535 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) (154000 $M^{-1}cm^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer.

4.8 Proteínas Totais em Tecido

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), sendo esta análise realizada para fazer a correção das dosagens de catalase e TBARS. O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteau, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

Reagente A: Foram dissolvidos 0,25 g de sulfato de cobre ($CuSO_45H_2O$) e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada.

Reagente C: Em 50 mL de reagente B foram adicionados 1 mL de reagente A.

Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin foram adicionados 1 mL água destilada.

Para a realização do ensaio, 10 μL do sobrenadante do homogenato de tecido hepático, foram diluídos em 90 μL de água destilada.

Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 μL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 μL do reagente D em todos os tubos, misturando

vigorosamente, e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660 nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta que foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato hepático.

4.9 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Kolmogorov–Smirnov* e expressos como média ± desvio padrão quando possuíam distribuição paramétrica e expressos como mediana quando possuíam distribuição não-paramétrica. As variáveis com distribuição normal foram avaliadas por meio do teste T de *Student*. E aquelas que não possuíam distribuição normal foram submetidas ao teste de *Mann-Whitney* (atividade enzimática da catalase e TBARS). Diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.00 para *Windows* (San Diego, Califórnia, USA).

5. Resultados

Dieta hipercolesterolemiante não altera a massa corporal

Os dois grupos possuíam massa corporal inicial semelhante como pode ser visto na Tabela 2. Ao final de oito semanas, a massa corporal não se alterou entre os grupos (Tabela 2, Figura 3). Embora os animais do grupo controle tivessem uma maior ingestão de alimentos, o consumo de calorias (Kcal) foi a mesma nos dois grupos (Figura 4 e Figura 5), demonstrando que a eficiência alimentar do grupo hipercolesterolêmico foi melhor do que o grupo controle ($p = 0,0003$).

Tabela 2. Massas e níveis séricos após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais

	C	H	Teste T de *Student* (valor de p)
MASSAS			
Massa inicial (g)	138,20 ± 16,34	138,30 ± 11,35	0,9904
Massa final (g)	199,00 ± 15,87	205,8 ± 13,96	0,3494
Ganho de massa (g)	60,81 ±14,34	67,51 ± 11,11	0,2800
Massa do fígado (g)	5,25 ± 0,55	7,86 ± 0,83	<0,0001***
Massa da gordura abdominal (g)	1,54 ± 0,46	1,63 ± 0,49	0,6905
Massa da gordura mesentérica(g)	2,36 ± 0,55	2,56 ± 0,56	0,4629
NÍVEIS SÉRICOS (jejum)			
ALT (U/mL)	14,24 ± 7,01	44,46 ± 13,71	<0,0001***
AST (U/mL)	38,03 ± 11,14	51,03 ± 12,10	0,0233*
Colesterol (mmol/L)	2,23 ± 0,29	3,25 ± 1,25	0,0389*
Triacilglicerol (mmol/L)	0,51 ± 0,15	0,37 ± 0,06	0,0126*
HDL (mmol/L)	1,78 ± 0,58	0,26 ± 0,10	<0,0001***
Glicose (mmol/L)	5,89 ± 0,92	5,45 ± 0,82	0,3003
Proteínas totais (g/dL)	6,86 ± 0,21	7,36 ± 0,39	0,0050**

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$.

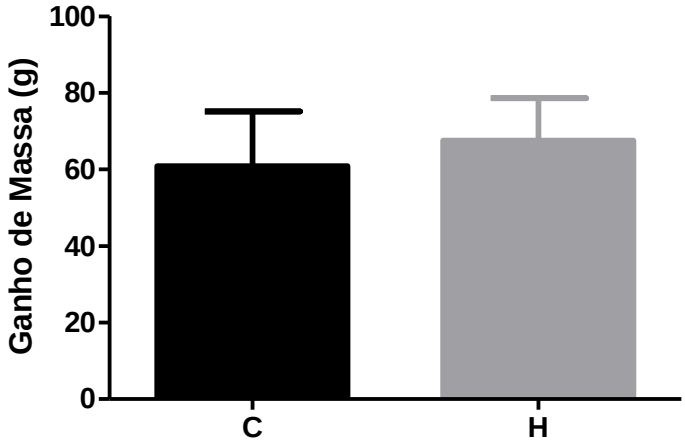

Figura 3. Ganho de massa em gramas após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Não há diferença estatística entre as médias dos grupos.

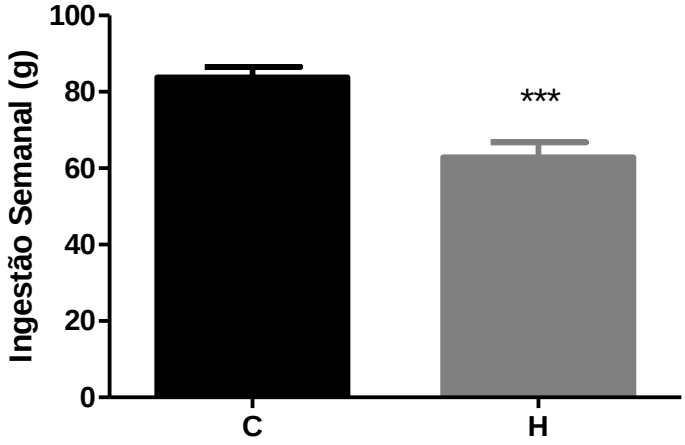

Figura 4. Ingestão semanal em gramas de dieta durante as oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Diferença estatística entre as médias com valor de *** $p \leq 0{,}0001$.

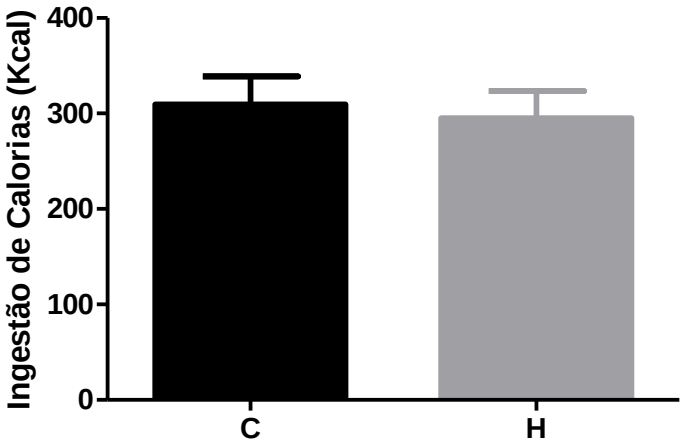

Figura 5. Ingestão semanal de calorias (Kcal) durante as oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Não há diferença estatística entre as médias dos grupos.

Dieta hipercolesterolemiante causa hepatomegalia

A dieta hipercolesterolemiante não resultou em aumento da massa corporal, mas induziu o acúmulo de lipídios no fígado (Tabela 2 e Figura 6). Não houve qualquer alteração na massa das gorduras mesentérica e abdominal (Tabela 2 e Figura 6).

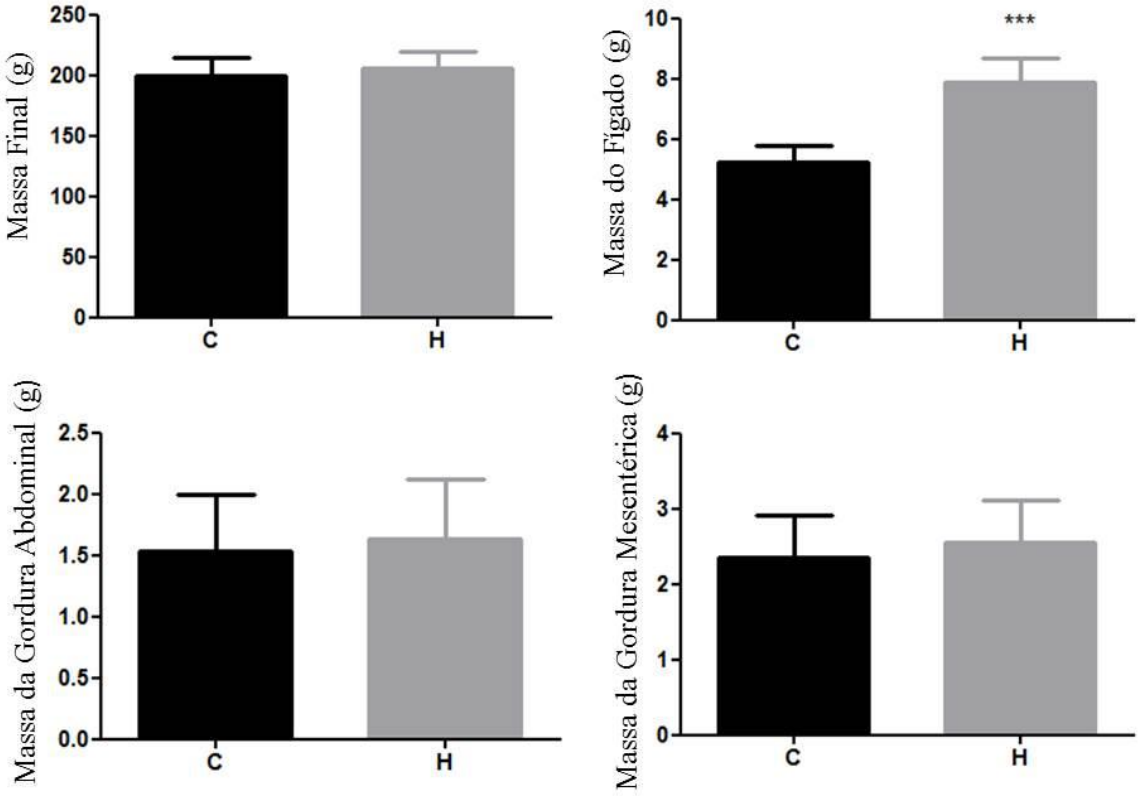

Figura 6. Massa final e massa dos órgãos após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Diferença estatística entre as médias com valor de *** $p \leq 0{,}0001$.

A dieta hipercolesterolemiante aumenta os níveis séricos das aminotransferases e de colesterol

Os níveis de enzimas hepáticas AST e ALT foram mais elevados no grupo H em relação ao grupo C (Tabela 2 e Figura 7). A dieta hipercolesterolemiante aumentou os níveis séricos de colesterol e de proteínas totais e diminuiu o nível de HDL, caracterizando a hipercolesterolemia. Houve redução nos níveis de triacilgliceróis (Tabela 2 e Figura 7).

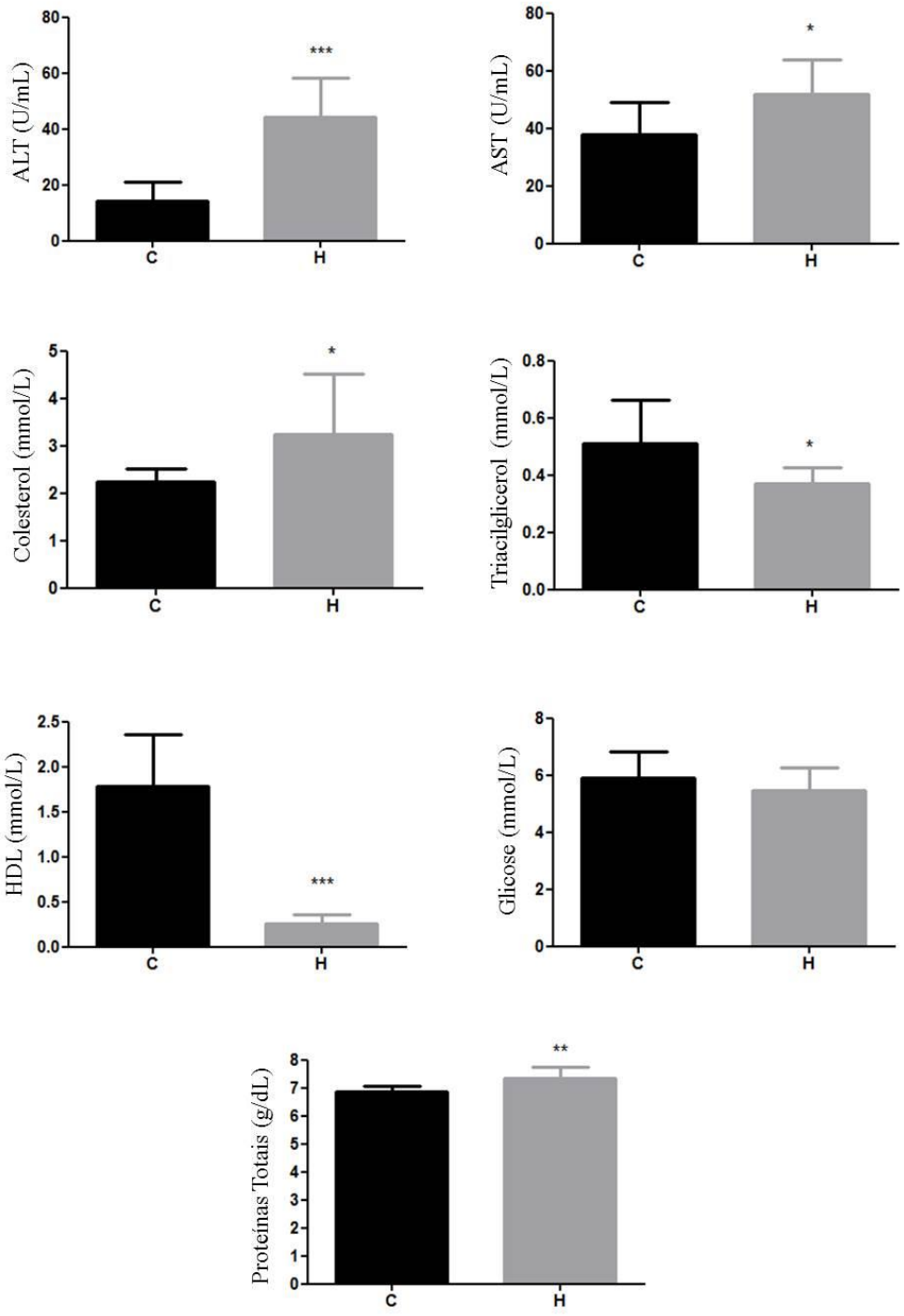

Figura 7. Metabólitos e proteínas séricos (jejum) após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Diferenças estatísticas entre as médias com valores de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$.

O modelo experimental é um bom modelo para o estudo da esteatose hepática

De acordo com a Tabela 3 pode-se notar que todos os animais do grupo H tiveram esteatose microvesicular e macrovesicular.

Tabela 3. Efeitos das dietas experimentais na histologia hepáticas após oito semanas.

	Esteatose Microvesicular n (%)	Esteatose Macrovesicular n (%)	Infiltrado Inflamatório n (%)	Fibrose n (%)
C (n=8)	1 (12,5)	0 (00)	3 (37,5)	0 (00)
H (n=8)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	0 (00)

(n=8). C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante.

As secções de fígado demonstram as seguintes características histológicas: o grupo C apresentou uma histologia normal do fígado e o grupo H apresentou esteatose com insignificante infiltrado inflamatório e ausência de fibrose (Figura 8).

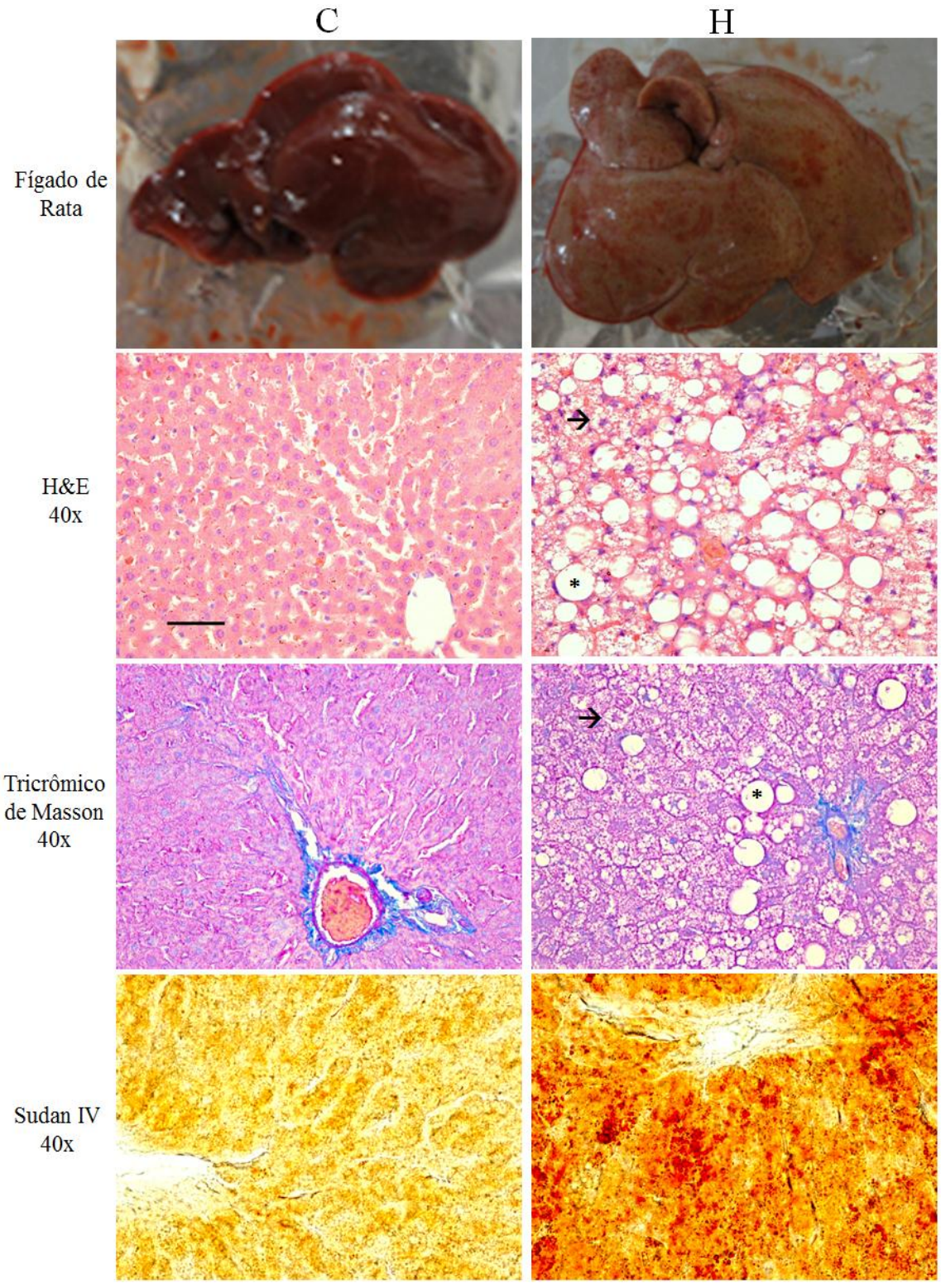

Figura 8. Fotomicrografias representativas de fígado de rata e seções de fígado obtidas após oito semanas em cada uma das duas dietas experimentais (C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante) e coradas com H&E, tricrômico de Masson e sudan IV. As setas (→) indicam hepatócitos com esteatose microvesicular e os asteriscos (*) hepatócitos com esteatose macrovesicular. Barra = 50µm.

A expressão de mRNA da NADPH oxidase é alterada no fígado com esteatose

A análise quantitativa de pRT-PCR mostrou uma expressão aumentada de mRNA das subunidades $p22^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$ da NADPH oxidase em ratas hipercolesterolêmicas se comparado ao grupo C (Figura 9).

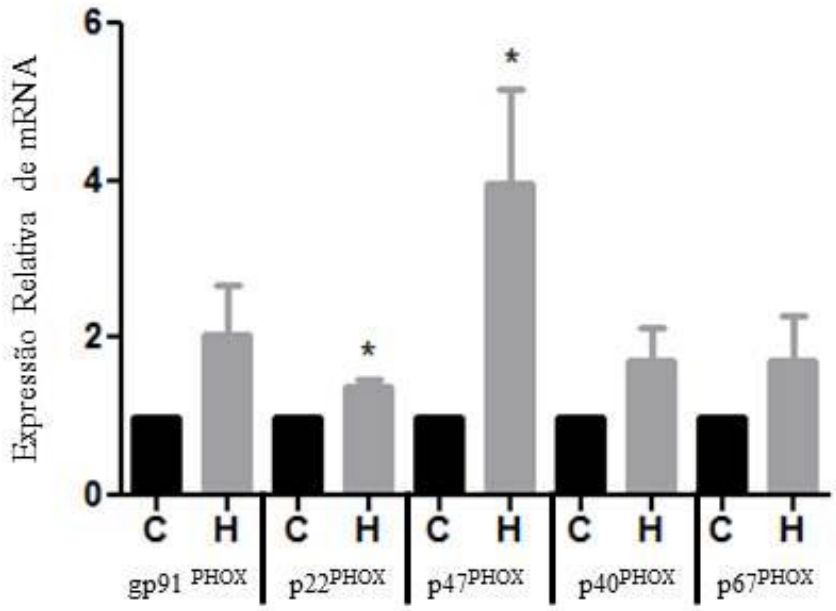

Figura 9. Expressão de mRNA das subunidades da NADPH oxidase no fígado após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Diferenças estatísticas entre as médias com valor de * $p \leq 0,05$.

A atividade e expressão de enzimas antioxidantes e TBARS também são alteradas pelo acúmulo de lipídios no fígado

A atividade da catalase não apresentou diferenças significativas entre os grupos, mas a expressão de mRNA foi diminuída no grupo H. Em contrapartida, a SOD-Cu/Zn apresentou atividade reduzida e a expressão do mRNA permaneceu inalterada. O conteúdo de glutationa total hepática foi de 1,19 vezes maior no grupo H em comparação ao grupo controle e a expressão de mRNA estava diminuída. Em comparação com os animais do grupo controle, as ratas do grupo H tiveram um aumento de 1,3 vezes de TBARS (Figuras 10 e 11).

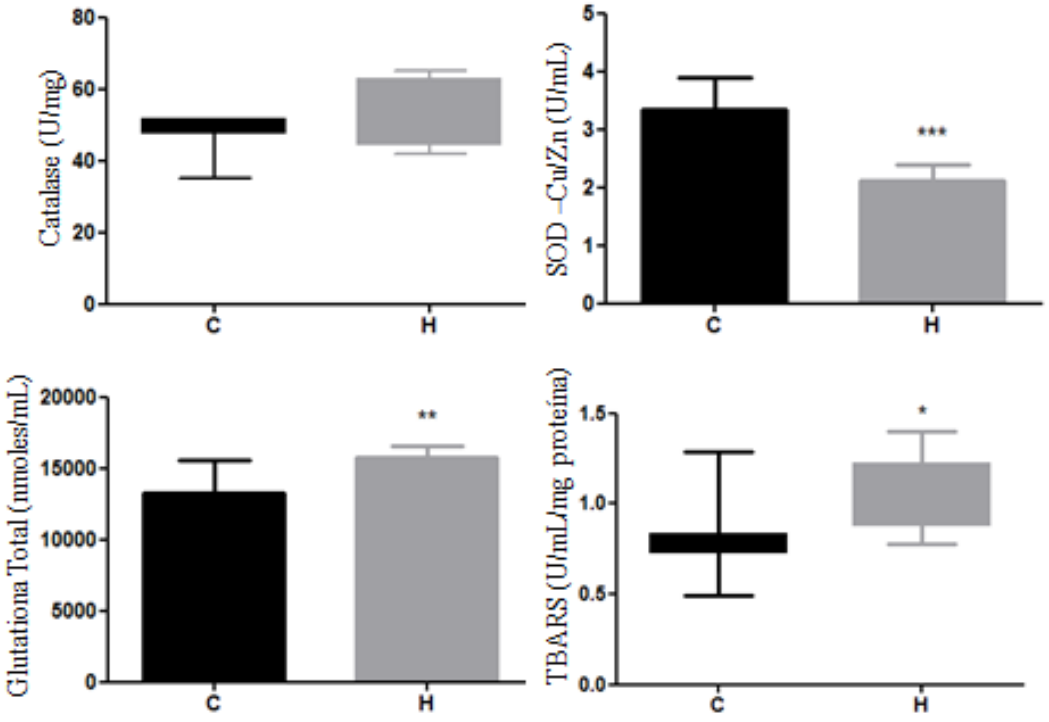

Figura 10. Atividade antioxidante de enzimas e biomarcador da peroxidação lipídica após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student* para SOD e glutationa total e os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Para catalase e TBARS utilizou-se o teste de *Mann-Whitney* e os dados estão expressos como mediana (mínimo e máximo). (n=8). Diferenças estatísticas entre as médias com valores de * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$.

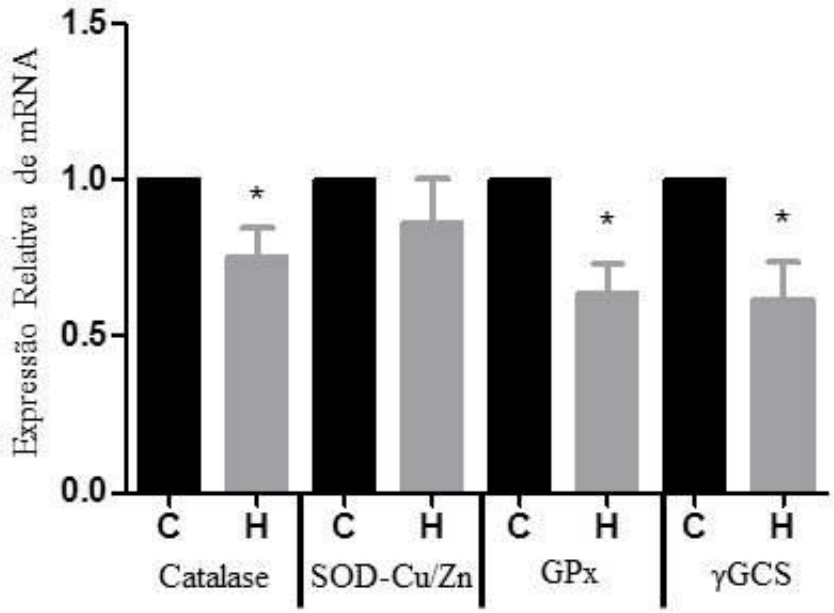

Figura 11. Expressão de mRNA das enzimas antioxidantes no fígado após oito semanas de tratamento com as dietas experimentais. C, grupo que recebeu dieta padrão; H, grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante. Para a análise estatística utilizou-se o teste T de *Student*. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. (n=8). Diferenças estatísticas entre as médias com valor de * $p \leq 0,05$.

6. Discussão

Estudos em animais demonstraram uma forte associação entre a composição da dieta e o desenvolvimento de esteatose hepática, por isso, tem sido postulado que os hábitos alimentares podem promover DHGNA em seres humanos. Os mecanismos pelos quais a dieta pode desempenhar tal papel incluem a modulação do acúmulo de TAG no fígado e a regulação da atividade antioxidante, bem como alterações na sensibilidade à insulina e do metabolismo de triacilglicerol (CAVE *et al.,* 2007; JENKINS *et al.,* 2006; LAZO; CLARK, 2008). Tanto a ingestão de carboidratos (SOLGA *et al.,* 2004) quanto a ingestão de gordura em excesso podem induzir o aumento da glicose, de ácidos graxos livres, e das concentrações de insulina, de forma independente ou em conjunto (FINELLI; TARANTINO, 2012; LAZO; CLARK, 2008).

A dieta contendo 25% de óleo de soja e 1% de colesterol promoveu hipercolesterolemia em ratas. A redução sérica de TAG desses animais era esperada, pois uma redução similar em ratas alimentados com a mesma dieta foi observada por Turbino-Ribeiro *et al.,* (2003) e Souza *et al.,* (2010). Souza *et al.,* (2010) sugeriram que a razão destes resultados é a grande quantidade de gordura insaturada utilizada nestas dietas, uma vez que é bem conhecido que os ácidos graxos insaturados inibem enzimas importantes relacionadas com o metabolismo de VLDL no fígado, resultando em níveis mais baixos de TAG no plasma.

Não há um único marcador bioquímico que pode confirmar o diagnóstico da DHGNA ou distinguir entre esteatose, EHNA e cirrose, mas testes de alterações da função do fígado são comuns em pacientes com esteatose hepática, com elevações de ALT e AST geralmente não superior a quatro vezes o limite superior de normalidade (LEWIS; MOHANTY, 2010; PRATT *et al.*, 2000; TORRES; HARRISON, 2008). A biópsia hepática é o padrão ouro para o diagnóstico de DHGNA, considerando que é o único método que pode distinguir entre esteatose, EHNA e grau de fibrose (ADAMS; ANGULO, 2006; PETINELLI *et al.*, 2011; SAADEH *et al.*, 2002). Histologicamente, a EHNA é semelhante à hepatite induzida por álcool, com presença de esteatose macrovesicular, infiltrado inflamatório, balonamento de hepatócitos, necrose, corpúsculos hialinos de Mallory e fibrose perissinusoidal ou cirrose (LEE, 1995; MATTEONI *et al.*, 1999) .

Os resultados mostram que a dieta hipercolesterolemiante causou danos ao fígado, aumentou o estresse oxidativo e os níveis de colesterol em ratas. A lesão hepática foi caracterizada por hepatomegalia e aumento das atividades das enzimas AST e ALT. A histologia hepática revelou que os animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiante apresentaram acúmulo de lipídios nos hepatócitos, conforme demonstrado por H&E e pela intensidade de coloração vermelha em sudan IV. Estes resultados em conjunto indicam que o acúmulo de lipídios foi prejudicial para este órgão. A coloração de tricrômico de Masson, que indica presença de fibrose, não revelou nenhuma diferença entre os grupos. Assim, é evidente que os animais alimentados com a dieta hipercolesterolemiante apresentaram apenas esteatose, sem progressão para EHNA e cirrose, provando que a dieta hipercolesterolemiante consistindo de 25% de óleo de soja e de 1% de colesterol administrada durante oito semanas foi eficaz na indução de esteatose hepática em ratas Fischer.

Durante o desenvolvimento da DHGNA, há um aumento da produção de ERO, muitas vezes levando a uma maior peroxidação de lipídios hepáticos (LUDWIG *et al.*, 1997; MORÁN-RAMOS *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que o consumo de dieta hipercolesterolemiante aumentam TBARS no fígado, indicando aumento do estresse oxidativo. Horoz *et al.* (2005) mostraram que os pacientes com esteatose e EHNA também têm níveis mais elevados de TBARS. Sabe-se que o estresse oxidativo pode ocorrer devido ao aumento de pró-oxidantes e, ou por redução das enzimas antioxidantes. O aumento da atividade da NADPH oxidase tem sido relatado em modelos animais de EHNA, nos quais antioxidantes dietéticos ou inibidores da NADPH oxidase melhoraram a progressão da doença (CARMIEL-HAGGAI *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2007; SANCHO *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2010). Em razão disso, decidimos investigar se haveria mudanças na expressão gênica de subunidades deste complexo enzimático neste modelo.

A subunidade $p47^{PHOX}$ da NADPH oxidase é a principal responsável pelo transporte do complexo citosólico do citosol para a membrana durante a ativação da oxidase. Antes dos componentes citosólicos serem transferidos para a membrana, no entanto, a $p47^{PHOX}$ deve ser extensivamente fosforilada (BABIOR, 1999). Quando $p47^{PHOX}$ é fosforilada, liga-se a subunidade $p22^{PHOX}$ e essa interação é provavelmente responsável pela ativação da oxidase (BABIOR, 2004). A subunidade $p22^{PHOX}$ funciona como uma subunidade integral do transportador final de elétrons da NADPH para o oxigênio molecular na geração de ânion superóxido (FUKUI *et al.*, 1997). Neste estudo, foi encontrado um aumento da expressão das subunidades $p47^{PHOX}$ e $p22^{PHOX}$ da NADPH oxidase no grupo H, indicado que este aumento

pode estar contribuindo para a ativação do complexo enzimático favorecendo assim, a geração de ERO.

Sabe-se que a redução da atividade das enzimas antioxidantes pode contribuir para o aumento do estresse oxidativo. Em nosso estudo, observamos de modo geral, que os fígados de ratas hipercolesterolêmicas tiveram redução na expressão de mRNA de enzimas antioxidantes. Possivelmente, a não confirmação da redução nas atividades de todas as enzimas antioxidantes avaliadas se deve ao fato de que a pequena alteração na expressão gênica pode não ter refletido nas atividades das enzimas, mas pode ser que em longo prazo as reduções na expressão gênica possam resultar em menores atividades das enzimas que não estavam reduzidas.

Em conjunto, os nossos dados mostram uma mudança nos sistemas pró-oxidante/antioxidante, o que resultou no aumento de TBARS, aumento da expressão das subunidades $p22^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$ da NADPH oxidase e redução da expressão de enzimas antioxidantes. Estes resultados indicam que a dieta utilizada neste estudo foi capaz de induzir a DHGNA.

Acreditamos que a doença não evoluiu para EHNA devido ao tempo de tratamento aplicado. Savard *et al.* (2013) realizaram experimentos preliminares com camundongos quando decidiram testar contribuições relativas de gordura e de colesterol da dieta alimentar e a sua interação com o desenvolvimento de NASH. Nestes experimentos preliminares os animais também foram sacrificados após oito e doze semanas além das trinta semanas que era o tempo final. Esteatose hepática e inflamação foram bem estabelecidas, quando os camundongos foram sacrificados nas oitava e décima segunda semana após o início da dieta rica em gordura (15%) e colesterol (1%) e foram associadas com elevação de ALT, obesidade e resistência à insulina. No entanto, não houve fibrose nos dois tempos iniciais. Fibrose e esteato-hepatite fibrosante foram desenvolvidas quando os animais foram expostos a essa dieta durante 30 semanas. Além disso, de acordo com o trabalho de Silva *et al.* (2008) desenvolvido em nossos laboratórios, ratos alimentados com a mesma dieta hipercolesterolêmica durante 16 semanas, ou seja, o dobro de tempo de nosso tratamento, apresentaram esteatose microvesicular e macrovesicular intensa, inflamação perivascular e parenquimal moderada e neoformação de colágeno.

O presente modelo experimental fornece uma interessante base de estudos para o desenvolvimento de estratégias de tratamento da DHGNA, pois apresenta as condições

necessárias para simular o início dessa doença e é neste ponto que os esforços devem ser concentrados de forma a encontrar um tratamento que seja capaz de evitar a progressão da esteatose à EHNA.

7. Conclusão

A dieta hipercolesterolemiante contendo 25% de óleo de soja e 1% de colesterol e administrada durante oito semanas foi eficaz na indução de esteatose hepática em ratos, constituindo-se, portanto, em um bom modelo para o estudo de esteatose.

Por meio de nossos resultados experimentais provamos que a esteatose induz alterações na expressão de mRNA das enzimas antioxidantes e das subunidades $p22^{PHOX}$ e $p47^{PHOX}$ na NADPH no fígado e, consequentemente, uma alteração no equilíbrio redox. Este fato é um importante passo para, no futuro, definir novas estratégias para o tratamento da doença hepática gordurosa não alcóolica.

8. Referências

ADAMS L.A.; ANGULO P. **Treatment of non-alcoholic fatty liver disease.** Postgrad Med J. v. 82, p. 315-322. 2006.

AEBI H. **Catalase in vitro.** Methods Enzymol. v. 105, p. 121–126. 1984.

AI Z-L. et al. **The Role of Hepatic Liver X Receptor α- and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c-mediated Lipid Disorder in the Pathogenesis of Non-alcoholic Steatohepatitis in Rats**. J. Inter. Med. Res. v. 39, p. 1219 – 1229. 2011.

ALKHOURI N. et al. **Neutrophil to lymphocyte ratio: a new marker for predicting steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.** Liver Int. v.32, p. 297-302. 2011.

ANGULO P. **Nonalcoholic fatty liver disease.** N Eng J Med. v. 346, p. 1221-1231 .2002.

ANSTEE Q.M.; GOLDIN R.D. **Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research**. Int. J. Exp. Path. v. 87, p. 1–16. 2006.

BABIOR B.M. **NADPH oxidase**. Curr Opin Immunol. v. 16, p. 42–47. 2004.

BABIOR B.M. **NADPH Oxidase: An Update.** Blood. v. 93, p. 1464-1476. 1999.

BARREIROS A.L.B.S.; DAVID J.M., DAVID J.P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Quim. Nova. v. 29, p. 113-123. 2006.

BERRA C.M.; MENCK C.F.M.; DI MASCIO P. **Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular.** Quim. Nova. v. 29, p. 1340-1344. 2006.

BRUNT E.M.; TINIAKOS D.G. **Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.** World J Gastroenterol. v. 16, p. 5286–5296. 2010.

BUEGE J.A.; AUST S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. Methods Enzymol. v. 52, p. 302–310. 1978.

CARMIEL-HAGGAI M.; CEDERBAUM A. I.; NIETO N. **A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats.** FASEB J. v. 19, p. 136–138. 2005.

CARVALHEIRA J. B.C.; SAAD M.J.A. **Doenças Associadas à Resistência à Insulina/ Hiperinsulinemia, Não Incluídas na Síndrome Metabólica.** Arq Bras Endocrinol Metab. v. 50, p. 360-367. 2006.

CAVE M. et al. **Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition**. J Nutr Biochem. v. 18, p. 184–195. 2007.

DE MINICIS S.; BATALLER R.; BRENNER D.A. **NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive or fibrogenic?** Gastroenterology. v.131, p. 272–275. 2006.

DIEHL A.M. **Esteato-hepatite alcoólica e não-alcoólica.** In: GOLDMAN L.; AUSIELLO D. [tradução Adriana Pittella Sudré… et al] Cecil Medicina. 23. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 156. p.1307-1311.

DREVET J.R. **The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story.** Mol Cell Endocrinol. v. 250, p.70–79. 2006.

ENJOJI M.; YASUTAKE K.; KOHJIMA M; NAKAMUTA M. **Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: the significance of cholesterol**. Int J Hepatol. 2012.

FERRÉ P.; FOUFELLE F. **Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c.** Diabetes Obes Metab. v. 12, p. 83–92. 2010.

FERREIRA A.L.A.; MATSUBARA L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev Ass Med Brasil. v. 43, p. 61-8. 1997.

FINELLI C.; TARANTINO G. **Is there any Consensus as to what Diet or lifestyle Approach Is the Right one for NAFLD Patients?** J Gastrointestin Liver Dis. v. 21, p. 293-302. 2012.

FUJITA K. et al. **Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases: Liver Microsomal Triglyceride Transfer Protein Activator May Be a Possible Therapeutic Agent in Non-alcoholic Steatohepatitis.** J Pharmacol Sci. v. 115, p. 270 – 273. 2011.

FUKUI T. et al. **p22phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Activity Are Increased in Aortas From Hypertensive Rats.** Circ Res. v. 80, p. 45-51. 1997.

FUKUNISHI S. et al. **Developement of fibrosis in Nonalcoholic Steatosis through Combination of a Synthetic Diet Rich in Disaccharide and Low-Dose Lipopolysaccharides in the Livers of Sucker (fa/fa) Rats.** J. Clin. Biochem. Nutr. v. 45, p. 322-328. 2009.

GANDRA P.G. et al. **Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico.** Quím. Nova. v. 27, p. 990-995. 2004.

GUERRA J.F.C. et al. **Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats**. J. Clin. Biochem. Nutr. v. 49, p. 188–194. 2011.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox.** Lancet. v. 355, p. 1179-1180. 2000.

HANSMANN J.; HERNANDO D.; REEDER S.B. **Fat confounds the observed apparent diffusion coefficient in patients with hepatic steatosis**. Magn Reson Med. v. 69, p. 545-52. 2013.

HOROZ M. et al. **Measurement of the total antioxidant response using a novel automated method in subjects with nonalcoholic steatohepatitis**. BMC Gastroenterol. v.5. 2005.

IKUTA T. et al. **Spontaneously hypertensive rats develop pronounced hepatic steatosis induced by choline-deficient diet: Evidence for hypertension as a potential enhancer in non-alcoholic steatohepatitis.** Hepatol Res. v. 42, p. 310–320. 2012.

JANEVSKI M. et al. **The effect of cocoa supplementation on hepatic steatosis, reactive oxygen species and LFABP in a rat model of NASH.** Comp. Hepatol. v.10, p. 1-24. 2011.

JANSEN P.L. **Non-alcoholic steatohepatitis**. Eur J Gastroenterol Hepatol. v. 16, p. 1079 – 1085. 2004.

JENKINS D.J. et al. **Nonalcoholic fatty liver, nonalcoholic steatohepatitis, ectopic fat, and the glycemic index.** Am J Clin Nutr. v. 84, p. 3–4. 2006.

JONES R.D.; HANCOCK J.T.; MORICE A.H. **NADPH oxidase: a universal oxygen sensor?** Free Radical Biol. Med. v. 29, p. 416–424. 2000.

JÚNIOR L.R. et al. **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo.** Quim. Nova. v. 24, p. 112-119. 2001.

KAMESH V.; SUMATHI T. **Antihypercholesterolemic effect of Bacopa monniera linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats.** Asian Pac. J. Trop. Med. p. 949-955. 2012.

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

KOTEISH A.; MAE D.A. **Animal models of steatohepatitis.** Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. v.16, p. 679–690. 2002.

KRAMMER J. et al. **Overexpression of CD36 and Acyl-CoA Synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 Increases Fatty Acid Uptake in Human Hepatoma Cells.** Int. J. Med. Sci. v. 8, p. 599-614. 2011.

LAZO M.; CLARK J.M. **The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective.** Semin Liver Dis. v. 28, p. 339–350. 2008.

LEE R.G. **Nonalcoholic steatohepatitis: tightening the morphological screws on a hepatic rambler.** Hepatology. v. 21, p. 1742–1743. 1995.

LEVIN I.; PETRASEK J.; SZABO G. **The Presence of p47phox in Liver Parenchymal Cells is a Key Mediator in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Steatosis.** Alcohol Clin Exp Res. v. 36, p. 1397–1406. 2012.

LEWIS J.R.; MOHANTY S.R. **Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update.** Dig Dis Sci. v. 55, p. 560–578. 2010.

LIEBER C.S. et al. **Model of nonalcoholic steatohepatitis.** Am J Clin Nutr. v. 79, p. 502–509. 2004.

LOWRY O.H. et al. **Protein measurement with the folin-phenol reagent.** J Biol Chem. v. 193, p. 265–275. 1951.

LU L.S. et al. **Apocynin alleviated hepatic oxidative burden and reduced liver injury in hypercholesterolaemia.** Liver Int. v. 27, p. 529–537. 2007.

LUDWIG J.; MCGILL D.B.; LINDOR K.D. **Review: nonalcoholic steatohepatitis.** J Gastroenterol Hepatol. v. 12, p. 398–403. 1997.

MARITIM A.C.; SANDERS R.A.; WATKINS J.B. **Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review.** J. Biochem. Mol. Toxicol. v. 17, p. 24-38. 2003.

MARRA F.et al. **Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis.** Trends Mol Med. v. 14, p. 72 − 81. 2008.

MATÉS J.M. **Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.** Toxicology. v. 153, p. 83–104. 2000.

MATOS S.L. et al. **Dietary models for inducing hypercholesterolemia in rats.** Braz. arch. biol. technol. v.48, p. 203-209. 2005.

MATTEONI C.A. et al**. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity.** Gastroenterology. v. 116, p. 1413-1419. 1999.

MAZZA R.P.J.; PEREIRA C.C.A.; WAITZBERG, D.L. **Doenças hepáticas**. In: Cuparri L. (Coord.). Nutrição Clínica no Adulto. Barueri, SP: Manole, 2005. cap. 16. p. 313-348.

MORÁN-RAMOS S. et al. **Opuntia ficus indica (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats**. J. Nutr. p. 1-8. 2012.

NAGARAJAN P. et al. **Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease**. World J Gastroenterol. v. 18, p. 1141-1153. 2012.

NAGATA K.; SUZUKI H.; SAKAGUCHI S. **Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis.** J. Toxicol. Sci. v. 32, p. 453-468. 2007.

PAIK Y-H.; BRENNER D.A. **NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic Fibrogenesis.** Korean J Hepatol. v. 17, p. 251-257. 2011.

PETTINELLI P.; OBREGÓN A.M.; VIDELA L.A. **Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease.** Nutr Hosp. v. 26, p. 441-450. 2011.

PRATT D.S., MARSHALL M., KAPLAN M.M. **Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients.** N Engl J Med. v. 342, p. 1266–1271. 2000.

RABÊLO L.A. et al. **Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular.** Arq Bras Cardiol. v. 94, p. 684-693. 2010.

REEVES P.G., NIELSEN F. H., FAHEY G.C. 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. v.123, p. 1939-51. 1993

RIBEIRO S.M.R. et al. **Antioxidantes da dieta**. In: COSTA N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. (Eds.). Nutrição Básica e Metabolismo. Viçosa: Editora UFV, 2008. cap.11, p. 382-400.

ROSSONI-JÚNIOR J.V. et al. **Annatto extract and β-carotene enhances antioxidant status and regulate gene expression in neutrophils of diabetic rats.** Free Radical Res. v. 46, p. 329-338. 2012.

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

SANCHO P.; MARTÍN-SANZ P.; FABREGAT I. **Reciprocal regulation of NADPH oxidases and the cyclooxygenase-2 pathway.** Free Radical Bio Med. v. 51, p. 1789–1798. 2011.

SAVARD C. et al. **Synergistic Interaction of Dietary Cholesterol and Dietary Fat in Inducing Experimental Steatohepatiti**s. Hepatology. v. 57, p. 81–92. 2013.

SIES H. **Biochemistry of Oxidative Stress.** Angew. Chem. Int. Edit. v. 25, p. 1058-71. 1986.

SIES H. **Strategies of antioxidant defense.** Eur. J. Biochem. v. 215, p. 213-9. 1993.

SILVA et al. **Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats.** Nutr Res. v.28, p. 391–398. 2008.

SOLGA S. et al. **Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease.** Dig Dis Sci. v. 49, p. 1578–1583. 2004.

SOUZA M.O. et al. **Diet supplementation with acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats.** Nutrition. v. 26, p. 804-10. 2010.

TAKAHASHI Y. et al. **Histopathological characteristics of non-alcoholic fatty liver disease in children: Comparison with adult cases.** Hepatol. Res. v. 41, p. 1066–1074. 2011.

TORRES D.M.; HARRISON S.A. **Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis.** Gastroenterology.v. 134, p. 1682–1698. 2008.

TURBINO-RIBEIRO S.M.L. et al. **Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but no blood pressure.** J Nutr. v. 133, p. 15–20. 2003.

VARELA-REY M. et al. **Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease.** The Int J Biochem Cell Biol. v. 41, p. 969–976. 2009.

XIONG Q. et al. **Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats.** J Biochem Mol Toxicol. v. 24, p. 361–367. 2010

YU J. et al. **Heme oxygenase-1 protects against steatohepatitis in both cultured hepatocytes and mice.** Gastroenterology. v. 138, p. 694–704. 2010.

Anexos

Anexo I. Protocolo Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2012/17 do projeto, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "*Caracterização histológica e bioquímica da esteatose hepática e metabolismo do colesterol em ratos alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados ou ácidos graxos insaturados e o possível efeito protetor do açaí*", que tem como responsável a Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em 30/06/2014.

Ouro Preto, 7 de maio de 2012

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Vice-coordenador da CEUA/UFOP

Anexo II. Trabalhos Realizados Durante o Mestrado

Resumo1

ABREU, I.C.M.E.; FIGUEIREDO, B.B.; SOUZA, M.O.; TEIXEIRA, K.R.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Effects of the Supplementation of Açaí Pulp in Antioxidant Enzymes of Rats Treated with Hypercholesterolemic Diet.

Referências adicionais: Brasil/Inglês; Cidade: Foz do Iguaçu – PR; Evento: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq; Inst. promotora/financiadora: SBBq. 2012. POSTER.

Resumo2

ABREU, I.C.M.E.; SILVA, M.; GUERRA, J.F.C.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Hypercholesterolemic diet increases expression of the NADPH oxidase subunit P22PHOX in rat liver.

Referências adicionais: Brasil/Inglês; Cidade: São Paulo – SP; Evento:6 th Congress of the Internacional Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics; Inst. promotora/financiadora: Internacional Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics. 2012. POSTER.

Apresentação Oral

FIGUEIREDO, B.B.; PEDROSA, M.L.; ABREU, I.C.M.E.; SOUZA, M.O.; SILVA. M.; GUERRA, J.F.C.; COSTA, D.C.; SILVA, M.E. Efeitos da suplementação da dieta com polpa de açaí sobre atividades de enzimas antioxidantes hepáticas e produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos em ratas Fischer hipercolesterolêmicas.

Referências adicionais: Brasil/Português; Cidade: Ouro Preto – MG; Evento: XX Seminário de Iniciação Científica da UFOP; Inst. promotora/financiadora: Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). 2012. APRESENTAÇÃO ORAL.