



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
TCC007- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



JONATHAN KOFI BASSAW

**EFEITOS DA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS E DA HIPERÓXIA
NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS BALB/C: ESTUDO BIOQUÍMICO E
HISTOPATOLÓGICO**

Ouro Preto

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
TCC007- TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EFEITOS DA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS E DA HIPERÓXIA
NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS BALB/C: ESTUDO BIOQUÍMICO E
HISTOPATOLÓGICO**

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos
requisitos para obtenção do título de bacharel em
Farmácia

Área de concentração: Bioquímica metabólica e
fisiológica

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Dantas Cangussú
Co-orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezzerra

JONATHAN KOFI BASSAW

Ouro Preto
2019

B297e Bassaw, Jonathan Kofi.
Efeitos da dieta rica em carboidratos refinados e da hiperóxia no fígado de camundongos Balb [manuscrito]: estudo bioquímico e histopatológico / Jonathan Kofi Bassaw. - 2019.

39f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Sílvia Dantas Cangussú.
Coorientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Obesidade. 2. Fígado- Doenças. 3. Hiperóxia. I. Cangussú, Sílvia Dantas. II. Bezerra, Frank Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 612.43



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 47ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 06 dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, sexta-feira, realizou-se, a partir das 13 horas e 30 minutos, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, Jonathan Kofi Bassaw, matrícula 15.1.2999, intitulada "Efeitos da dieta rica em carboidratos refinados e da hiperóxia no fígado de camundongos Balb/c: estudo bioquímico e histopatológico". A banca examinadora foi constituída pela doutoranda Ana Beatriz Farias de Souza (CBIOL/UFOP), pela Profa. Dra. Angélica Alves Lima (DEACL/UFOP), pelo co-orientador Prof. Dr. Frank Silva Bezerra e pela orientadora Profa. Dra. Sílvia Dantas Cangussú (DECBI/UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovção, com a NOTA 9,0. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da banca examinadora e pelo presidente do colegiado. Ouro Preto, 06 de dezembro de 2019.


Prof. Dra. Sílvia Dantas Cangussú / orientadora


Prof. Dr. Frank Silva Bezerra / co-orientador


Ana Beatriz Farias de Souza


Prof. Dra. Angélica Alves Lima


Prof. Dra. Glenda Nicoli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família pelos ensinamentos e exemplos e a todos que me ajudaram conseguir chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, professora Dr^a Sílvia Dantas Cangussú, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo apoio e aconselhamento na elaboração desta pesquisa. Agradeço-a também por ter acreditado no meu potencial, pelo voto de confiança que me deu, não podendo deixar de mencionar que sua dedicação e comprometimento são um verdadeiro exemplo para mim. Mesmo na ocasião em que estive longe, por questões ligadas à saúde, não deixou de orientar o trabalho, contribuindo para o seu desenvolvimento. Professora, certamente sem você este trabalho não seria possível.

Ao professor Dr. Frank Silva Bezerra, meu co-orientador, por compartilhar seus conhecimentos conosco, especialmente nos trabalhos desenvolvidos no laboratório, o que muito contribui para o aperfeiçoamento deste trabalho. Quero registrar minha gratidão pelo apoio, pela parceria e pelos conselhos.

À equipe do Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx), pela parceria fundamental no compartilhamento de informações, conhecimentos e pelas amizades que ali nasceram, laços importantes para o sucesso de qualquer trabalho. Não posso deixar de agradecer à Nícia, porque embora não a tenha conhecido pessoalmente, o trabalho dela foi essencial para o desenvolvimento do meu. Tendo a Nícia realizado um trabalho na mesma de linha de pesquisa, serviu como base para a realização desta pesquisa. À Keila Karine Duarte Campos, *in memoriam*, pela amizade e por servir de inspiração a todos nós que com ela tivemos a oportunidade de pesquisar. Que Deus a receba em glória e console todos os seus amigos e familiares! Ao Pedro Machado Alves Júnior, pela sua amizade e por me ajudar nas análises, tirando dúvidas e esclarecendo questões relacionadas ao desenvolvimento da pesquisa, valendo-se de sua experiência no laboratório. À Ana Beatriz e ao Thalles Castro, obrigado por nos ajudar na adaptação ao trabalho no laboratório, pelos esclarecimentos relacionados a rotina do espaço e por todo treinamento e ajuda ao longo do tempo em que estivemos juntos.

Natália Araújo, Camila de Oliveira, Mônica Campos, Amanda, Erika Tiemi, Matheus Rocha, obrigado pela parceria e ajuda, e por formarem o time mais incrível que algum pesquisador pode ter. Aos meus amigos, Douglas Dophine, Junio de Araújo, Marcos Salomão, Edney Sena, Agueda Martins, Raissa Ellen e seu marido, Diego, Maria Elisa, Charles e Talita Magalhães, o pessoal do ABU etc, por toda ajuda, cumplicidade, apoio e amizade.

RESUMO

A obesidade é uma doença com influências genéticas, sociais e ambientais e está relacionada a várias doenças crônicas não transmissíveis como intolerância à glicose, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). A obesidade provoca hipóxia que tem como consequência a produção de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez resultam em processo inflamatório. A DHGNA, que também leva à hipóxia, inclui um espectro de distúrbios que vão desde a esteatose à esteatoepatite e, finalmente, cirrose e hepatocarcinoma. O metabolismo hepático alterado e a remodelação do tecido na DHGNA perturbam a homeostase do oxigênio, gerando hipóxia grave do fígado. A suplementação de oxigênio pode ser utilizada no tratamento da hipóxia tecidual, no entanto, a exposição excessiva por longos períodos pode acarretar lesões teciduais. Assim, considerando que a DHGNA parece estar associada com obesidade e hipóxia, e que existem controvérsias em relação ao papel da hiperóxia na proteção/progressão de doenças hepáticas, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da hiperóxia na resposta oxidativa e na DHGNA em camundongos com sobrepeso. Vinte e quatro camundongos da linhagem BALB/c (machos, adultos, 5-7 semanas de idade) foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo (G1) recebeu uma dieta padrão por 12 semanas e o segundo grupo (G2) recebeu uma dieta rica em carboidratos refinados – 10% de açúcar, 45% de dieta padrão, 45% de leite condensado por 12 semanas. Após o tratamento dietético, G1 foi randomicamente dividido em Grupo Dieta Controle (GDC) e Grupo Dieta Controle + Hiperóxia (GDCH), e G2 foi randomicamente dividido em Grupo Dieta com alto teor de carboidratos refinados (GDR) e Grupo Dieta com alto teor de carboidratos refinados + Hiperóxia (GDRH). GDCH e GDRH foram expostos a 100% de oxigênio por 24 horas e GDC e GDR foram apenas expostos ao ar ambiente pelo mesmo período. Após o término do experimento os animais foram eutanasiados para coleta do fígado a fim de executar as análises histopatológicas e bioquímicas. Para análise estatística foi utilizada ANOVA OneWay seguida de pós-teste de Bonferroni. A atividade de SOD foi maior nos grupos expostos à hiperóxia indicando ativação do sistema antioxidante nesses animais. Entretanto, a atividade de CAT foi menor nos grupos GDCH, GDR e GDRH em relação aos controles e não houve diferenças na peroxidação lipídica entre os grupos. Os resultados demonstraram aumento dos depósitos de gordura nos animais do GDR quando comparados aos GDC, GDCH e GDRH. A análise histopatológica revelou que todos os grupos com exceção do controle apresentaram um influxo inflamatório. Esse resultado mostrou que tanto a dieta rica em carboidratos, quanto a exposição à hiperóxia podem levar lesões hepáticas, tais como, congestão sinusoidal, hiperemia e infiltrado inflamatório. Entretanto, a dieta rica em carboidratos isolada foi capaz de provocar lesões mais severas do que a exposição isolada à hiperóxia. Além disso, a hiperóxia foi capaz de amenizar as lesões provocadas pela dieta rica em carboidratos, inclusive a esteatose, sugerindo efeito protetor da hiperóxia na doença hepática gordurosa não alcoólica. Assim, podemos inferir que a hiperóxia possui papel protetor na DHGNA, entretanto, estes dados sugerem mais estudos para uma definição dos tempos de exposição em terapias futuras para melhorar a segurança da oxigenoterapia em pacientes.

Palavras-chave: obesidade/sobrepeso, hiperóxia, inflamação hepática, doença hepática gordurosa não alcoólica, radicais livres.

ABSTRACT

Obesity is a disease with genetic, social and environmental influences and is related to several chronic noncommunicable diseases such as glucose intolerance, diabetes, hypertension, heart failure and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Obesity leads to hypoxia (decreased oxygen supply to tissues) and consequently, the production of proinflammatory cytokines, which results in an inflammatory process. NAFLD, which also leads to hypoxia, includes a spectrum of disorders ranging from steatosis to steatohepatitis and ultimately cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Altered liver metabolism and tissue remodeling in NAFLD disrupt oxygen homeostasis, resulting in severe liver hypoxia. Oxygen supplementation may be used to treat tissue hypoxia; however, overexposure over long periods may lead to tissue damage. Considering that NAFLD appears to be associated with obesity/overweight and hypoxia, and there is controversy regarding the role of hyperoxia in the protection/progression of liver disease, the aim of this study was to evaluate the effects of hyperoxia on oxidative response and in NAFLD in mice with overweight. Twenty-four BALB/c mice (males, adults, 5-7 weeks old) were divided into two groups: the first group (G1) received a standard diet for 12 weeks and the second group (G2) received a refined carbohydrate diet (high calorie diet) - 10% sugar, 45% standard diet, 45% condensed milk for 12 weeks. After dietary treatment, G1 was randomly divided into Control Diet Group (GDC) and Control + Hyperoxia Diet Group (GDCH), and G2 was randomly divided into Hypercaloric Diet Group (GDR) and Hypercaloric Diet + Hyperoxia Group (GDRH). GDCH and GDRH were exposed to 100% oxygen for 24h and GDC and GDR were only exposed to ambient air for 24h. After the end of the experiment the animals were euthanized to collect liver in order to histopathologic and biochemical analyzes. Statistical analysis was performed using One Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. SOD activity was higher in groups exposed to hyperoxia indicating antioxidant system activation in these animals. However, CAT activity was lower in GDCH, GDR and GDRH groups compared to controls and there were no differences in lipid peroxidation between groups. The results showed increased fat deposits in GDR animals when compared to GDC, GDCH and GDRH. Histopathological analysis revealed that all groups except the control group had an inflammatory influx. This result showed that both carbohydrate-rich diets and exposure to hyperoxia can lead to liver lesions such as sinus congestion, hyperemia and inflammatory infiltrate. However, the high carbohydrate diet alone was able to cause more severe injuries than the isolated exposure to hyperoxia. Furthermore, hyperoxia was able to minimize the damage caused by the high-carbohydrate diet, including steatosis, suggesting a protective effect of hyperoxia in nonalcoholic fatty liver disease. Thus, we can infer that hyperoxia plays a protective role in NAFLD, however, these data suggest further studies for a definition of exposure times in future therapies to improve the safety of oxygen therapy in patients.

Key words: obesity/overweight, hyperoxia, liver inflammation, nonalcoholic fatty liver disease, free radicals

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose da dieta.....	20
Figura 2. Esquema representativo da exposição ao oxigênio.....	21
Figura 3. Características histopatológicas dos fígados de camundongos BALB/c.....	27
Figura 4. Análise morfométrica de esteatose em camundongos BALB/c.....	28
Figura 5. Porcentagem de células inflamatórias no parênquima hepático.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lesões observadas em microscopia óptica no fígado de camundongos BALB/c.....	26
Tabela 2. Biomarcadores do estresse oxidativo.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase
CCL5 - Ligante de quimiocina 5
CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
DHGA – Doença hepática gordurosa alcoólica
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMSO- Dimetilsulfóxido
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
GDC – Grupo dieta controle
GDCH – Grupo dieta controle + hiperóxia
GDR– Grupo dieta com alto teor de carboidratos refinados
GDRH – Grupo dieta com alto teor de carboidratos refinados + hiperóxia
GPx – Glutathione peroxidase
HE – Hematoxilina e Eosina
H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
IL-1- Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IMC- Índice de massa corporal
MTT- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazoli
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO – óxido nítrico
OH• – Radical hidroxila
OHB - Oxigenoterapia Hiperbárica
OMS- Organização Mundial da Saúde
O₂- Oxigênio
UFOP- Universidade Federal de Ouro Preto
SOD – Superóxido dismutase
TAE- Tecido adiposo epididimal
TAM- Tecido adiposo mesentérico
TAP- Tecido adiposo periuterino
TAR- Tecido adiposo retroperitoneal
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1.Geral.....	19
3.2.Específicos.....	19
4. METODOLOGIA.....	19
4.1. Animais.....	19
4.2. Dietas.....	20
4.3.Exposição ao oxigênio.....	20
4.4.Eutanásia, processamento e homogeneizado do tecido hepático.....	21
4.5.Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	21
4.6. Alterações histopatológicas do parênquima hepático.....	22
4.7.Biomarcadores de estresse e dano oxidativo.....	22
4.7.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	22
4.7.2. Atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD).....	23
4.7.3. Atividade de enzimas antioxidantes: Catalase (CAT).....	23
4.7.4. Proteína Carbonilada.....	24
4.8.Análises estatísticas.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1.Análises morfológicas e morfométricas do tecido hepático.....	25
5.2.Biomarcadores de estresse e dano oxidativo.....	29
6. CONCLUSÕES.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32
8. ANEXO.....	38

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial complexa com influências genéticas, sociais e ambientais (FRIEDMAN, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. Tal situação resulta de um desequilíbrio entre ingestão de alimentos e gasto de energia a favor da quantidade de energia ingerida em comparação com a energia gasta (WHO, 2018). A prevalência mundial de sobrepeso e obesidade dobraram desde 1980, a ponto de quase um terço da população mundial ser classificada com sobrepeso ou obesidade (GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK, 2017).

A prevalência de obesidade é maior em mulheres do que homens e aumenta com a idade (SWINBURN et al., 2011). Embora a obesidade varie entre países e regiões, essas tendências são relativamente uniformes em todo o mundo (GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK, 2017). O aumento da prevalência de obesidade provavelmente é devido a uma interação complexa entre mudanças no ambiente alimentar, atividade física, fatores socioeconômicos, ambientais e genéticos (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). O índice de massa corporal (IMC) é normalmente usado para definir sobrepeso e obesidade em estudos epidemiológicos. O IMC é calculado dividindo a massa corporal em (kg) pela altura ao quadrado em (m^2), como mostra a seguinte fórmula: $IMC = \frac{kg}{m^2}$ (WHO, 2018). Se o resultado dessa equação for entre 30 a 34,9; 35 a 39,9 ou ≥ 40 o indivíduo será classificado com obesidade grau I, II ou III, respectivamente (JAMES et al., 2001). Em modelos experimentais de camundongos, a obesidade pode ser calculada pelo índice de adiposidade (IA) que é obtido pela soma do tecido adiposo periuterino (TAP) ou tecido adiposo epididimal (TAE), tecido adiposo retroperitoneal (TAR) e tecido adiposo mesentérico (TAM) dividido pela massa corporal vezes cem, conforme mostra a fórmula a seguir: $IA = \frac{(TAP \text{ ou } TAE + TAR + TAM)}{\text{massa corporal}} \times 100$ (OLIVEIRA et al., 2013).

No entanto, o IMC tem baixa sensibilidade e existe uma grande variabilidade na porcentagem de gordura corporal para qualquer valor de IMC, parcialmente atribuído à idade, sexo e etnia. Por exemplo, os asiáticos têm maior porcentagem de gordura corporal do que os caucasianos para o mesmo IMC (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

A doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) é considerada a forma mais comum de doença hepática crônica com prevalência de 30% na população mundial, sendo associada com obesidade/sobrepeso e diabetes. Nos Estados Unidos a DHGNA afeta 30% da população e 90% dos indivíduos obesos ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$) (BOSCH et al., 2004; PAGE; HARRISON, 2009). As alterações morfológicas encontradas na DHGNA são semelhantes às encontradas na hepatite alcóolica, caracterizando-se por acúmulo de lipídeos no parênquima hepático (esteatose simples), esteatose com hepatócitos balonados e inflamação lobular (esteatoepatite), alterações necro-inflamatórias, fibrose e regeneração lobular (cirrose) em indivíduos sem consumo considerável de álcool (AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION, 2002; BYRNE, 2010). A esteatose hepática é a etapa chave no desenvolvimento e progressão de patologia subsequente e ainda não houve sucesso no tratamento farmacológico dessa condição (SUZUKI et al., 2014). Assim, existe grande interesse no desenvolvimento de terapias para a esteatose hepática.

A hipóxia foi descrita na zona pericentral dos lóbulos hepáticos na doença hepática gordurosa alcoólica (DHGA) (VIDELA; BERNSTEIN; ISRAEL, 1973; ARTEEL et al., 1997; FRENCH, 2004), e foi sugerido que o baixo gradiente de oxigênio seria uma das causas da esteatose hepática e das desordens subseqüentes (JUNGERMANN; KIETZMANN, 2000). Estudos mais recentes descreveram a hipóxia também na DHGNA (MANTENA et al., 2009). Assim, o metabolismo hepático alterado e a remodelação do tecido na doença hepática gordurosa perturbam a homeostase do oxigênio, resultando em hipóxia grave do fígado (NASRIN et al., 2010; SUZUKI et al., 2014).

A diminuição das trocas gasosas devido à constrição dos capilares sinusóides hepáticos, ao inchaço dos hepatócitos e ao acúmulo de cicatriz fibrótica, resulta no desenvolvimento de hipóxia na DHGNA (KONDO et al., 2010). Nesse sentido, a suplementação de oxigênio pode ser usada para o tratamento de hipóxia tecidual, no entanto, a exposição excessiva por longos períodos, está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1-beta (IL-1 β) (VALENÇA et al., 2007; NAGATO et al., 2012).

O oxigênio tem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que em altas concentrações são capazes de promover dano oxidativo biológico nas moléculas tais como proteínas e ácidos graxos oligoinsaturados das membranas celulares (MARTINS CHAVES et al., 2000; FUBINI; HUBBARD, 2003). Entretanto, nosso organismo disponibiliza de um

sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), sendo que a primeira age realizando a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) e as demais decompõem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (BARBOSA et al., 2010). Mesmo assim, algumas vezes ocorre um desbalanço entre a produção de ERO e defesa antioxidante, o que caracteriza o estresse oxidativo (HALLIWELL, 1989; YU, 1994).

Existem controvérsias sobre o papel da hiperóxia na proteção/progressão de doenças hepáticas. Estudos realizados em ratos intoxicados com tetracloreto de carbono (CCl_4) (BERNACCHI et al., 1984), em pacientes com cirrose hepática (KREIMER et al., 2011) e em ratos submetidos à isquemia e reperfusão (LOSADA et al., 2014) indicaram um efeito protetor da hiperóxia para o tecido hepático. Por outro lado, estudos realizados em modelo animal de fibrose hepática demonstraram que tanto a hipóxia quanto a hiperóxia aceleraram a progressão da fibrose hepática em ratos (LEE; DO; KIM, 2014). Além disso, ZANGL et al. (2014) demonstraram, em modelo animal de isquemia/reperfusão, que a hiperóxia agravou a lesão hepática em camundongos.

Considerando que a DHGNA parece estar associada com a obesidade/sobrepeso e com hipóxia, que ainda não houve sucesso no tratamento farmacológico dessa condição e que existem controvérsias em relação ao papel da hiperóxia na progressão de doenças hepáticas, nosso objetivo é avaliar os efeitos da dieta rica em carboidratos refinados e da hiperóxia na resposta oxidativa hepática e na DHGNA de camundongos BALB/c.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O aumento da prevalência da obesidade tornou-se um grande problema de saúde mundial em adultos, bem como em crianças e adolescentes (ROTH et al., 2004). A obesidade é uma doença com influências genéticas, sociais e ambientais. A prevalência mundial de sobrepeso e obesidade aumentou em mais de 27% nas últimas três décadas, elevando o número de indivíduos afetados para aproximadamente 2,1 bilhões (NG; FLEMING; ROBINSON, 2014). A prevalência mundial de obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016 (WHO, 2018). Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais estavam obesos, 39% (39% dos homens e 40% das mulheres) estavam acima do peso. No geral, cerca de 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesos em 2016 (WHO, 2018).

A ocorrência da obesidade está cada vez mais acentuada e está associada a várias doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, resistência à glicose, diabetes, câncer e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (BESKE et al., 2002; BHASKARAN et al., 2014). Modelos experimentais de obesidade têm sido desenvolvidos com a finalidade de compreender a fisiopatologia dessa doença (YORK, 1996). Segundo, DIEMEN et al, (2006) o modelo de obesidade experimental que mais se assemelha a obesidade humana está condicionado a dietas com alto teor de carboidratos refinados e provou ser eficaz na indução da obesidade (DIEMEN et al., 2006).

A prevalência crescente de obesidade e as várias doenças crônicas não transmissíveis associadas a ela promoveu o entendimento do tecido adiposo como participante, potencialmente ativo, no controle dos processos fisiológicos e patológicos (KRALISCH et al., 2006). O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino capaz de mediar efeitos biológicos no metabolismo e inflamação, contribuindo para a manutenção da homeostase energética e, provavelmente, para a patogênese de complicações metabólicas (WOZNIAK et al., 2009). O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino por secretar citocinas pró-inflamatórias tais como Factor de Necrose Tumoral- α (TNF α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), ligante de quimiocina 5 (CCL5) e citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL- 10), bem como hormônios como resistina, leptina e adiponectina envolvidos na resposta inflamatória e na sensibilidade à insulina. Sendo assim, a obesidade é considerada uma inflamação crônica (JUGE-AUBRY; MEIER; HENRICHOT, 2005; ANTUNA-PUENTE et al., 2008; RADIN; SHARKEY; HOLYCROSS, 2009). CINTI (2012) demonstrou a complexidade do órgão adiposo com propriedades altamente plásticas que inclui a capacidade de suas células parenquimatosas (os

adipócitos) de reprogramar seus genes e transdiferenciar em células com uma morfologia e fisiologia diferentes, o que pode ser explorada na próxima geração de estratégias terapêuticas para combater a crescente incidência de doenças metabólicas, como a obesidade.

Estudos mostram que a obesidade leva à hipóxia, ou seja, diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos, e como consequência a hipóxia desregula a produção de adipocitocinas nos adipócitos (NOROUZIRAD; GONZÁLEZ-MUNIESA; GHASEMI, 2017). Esse efeito é mediado pelo estresse do retículo endoplasmático e pela regulação pós-transcricional. Assim, a hipóxia do tecido adiposo local é parcialmente responsável pela produção desregulada de adipocitocinas e pela síndrome metabólica na obesidade (HOSOGAI et al., 2007; KAWASAKI et al., 2012). Estudos realizados em humanos e roedores demonstraram que há produção de citocinas pró-inflamatórias que promovem a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, o que resulta em um processo inflamatório (WEISBERG et al., 2003; CANCELLO et al., 2005).

A obesidade é um dos fatores de risco principais para o desenvolvimento da DHGNA. DHGNA é agora a principal causa de doença hepática crônica nos EUA e na Europa e está aumentando em todo o mundo (YOUNOSSI et al., 2017). O aumento na prevalência da obesidade/sobrepeso é, portanto, o principal fator para a maior prevalência de DHGNA. A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) representa um espectro de doença hepática com estágios-chave que consistem em esteatose hepática, esteato-hepatite, fibrose e cirrose (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014).

O oxigênio é um dos agentes terapêuticos mais utilizados possuindo uma gama distinta de doses e efeitos adversos bem definidos em altas doses (TIBBLES; EDELSBERG, 1996). O oxigênio está amplamente disponível e é geralmente prescrito por equipe médica em condições específicas para aliviar ou prevenir hipóxia tecidual (NATHAN, 2003). Acredita-se que a toxicidade do oxigênio resulta da formação de ERO que excedam a quantidade que pode ser desintoxicada pelos sistemas antioxidantes disponíveis nos tecidos. Embora os mecanismos de dano das espécies reativas de oxigênio a uma matriz substancial de sistemas celulares como proteínas, enzimas, lipídios da membrana e ácidos nucleicos já tenham sido caracterizados, há grandes lacunas na compreensão dos estágios intermediários das cascatas fisiopatológicas que seguem essas reações (BITTERMAN, 2009).

A hiperóxia também possui efeitos benéficos. Tem a capacidade de reverter um quadro de hipóxia e auxilia na redução de inflamação local (QUINTERO et al., 2010). Em um estudo feito por ERCIN et al (2009) em ratos, o tratamento de OHB (Oxigenoterapia Hiperbárica) com 100% de oxigênio aplicado por 7 dias foi significativamente eficaz na redução da gravidade da colite, na prevenção da perda de peso e na redução da atividade do óxido nítrico (NO).

DHGNA parece estar associada com a obesidade/sobrepeso e com hipóxia. Estudos que avaliam o efeito da hiperóxia na DHGNA ainda são poucos, demonstrando assim a necessidade de estudos mais específicos para compreender os mecanismos envolvidos no processo e avaliar as controvérsias em relação ao papel da hiperóxia na progressão de doenças hepáticas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos da dieta com alto teor de carboidratos e da hiperóxia na histopatologia e na resposta oxidativa hepática de camundongos BALB/c.

3.2. Específicos

- Analisar o padrão histológico do parênquima hepático
- Analisar o processo inflamatório no parênquima hepático.
- Avaliar oxidação de lipídeos no tecido hepático
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados 24 camundongos BALB/c, machos, adultos, com idade entre 5 a 7 semanas, provenientes do biotério do Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas (21 ± 2 °C, $50 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19 às 7h) e exaustão 15 min/h. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) protocolo número 2013/58 (**ANEXO**). Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais: Grupo Dieta Controle (GDC): animais que receberam uma dieta padrão para roedores (AIN-93M) durante 12 semanas; Grupo Dieta Controle e Hiperóxia (GDCH): animais que receberam uma dieta padrão para roedores (AIN-93M) durante 12 semanas e foram expostos a hiperóxia por 24 horas; Grupo Dieta com alto teor de carboidratos (GDR): animais que receberam uma dieta com alto teor de carboidratos para roedores durante 12 semanas; Grupo Dieta com alto teor de carboidratos e hiperóxia (GDRH): animais que receberam uma dieta com alto teor de carboidratos para roedores durante 12 semanas e foram expostos à hiperóxia por 24 horas.

4.2. Dietas

Os animais dos grupos GDC e GDCH foram alimentados com ração padrão (AIN-93M), Labina-Purina e os camundongos dos grupos GDR e GDRH foram alimentadas com ração de alta palatabilidade, composta por 10% de açúcar cristal, 45% de ração comercial e 45% de leite condensado Nestlé® utilizada para promover a sobrepeso ou obesidade nos animais conforme descrito anteriormente (MENEZES-GARCIA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013). A ração de alta palatabilidade foi preparado no laboratório de fisiopatologia experimental (LAFEx). Todos os requerimentos nutricionais apresentados por ambas as rações estão compatíveis com as recomendações do Council (1995).

	Dieta controle	Dieta rica em carboidratos refinados
kcal/g	4,0	4,4
Carboidratos (%)	65,8	74,2
Gordura (%)	3,1	5,8
Proteína (%)	31,1	20
Sacarose (g/100g)	37,0	48,4

Figura 1. Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose da dieta controle e da dieta rica em carboidratos refinados (OLIVEIRA et al., 2013).

4.3. Exposição ao oxigênio

Foram adquiridos da empresa White Martins (São Paulo, SP, Brazil) quatro cilindros contendo O₂ medicinal (8.000L de O₂/cilindro). Estes, foram acoplados à uma válvula reguladora de pressão e um fluxômetro (com amplitude de mensuração de 0-15L/min.). Um conduto de silicone conecta o fluxômetro à uma câmara de isolamento de vidro (transparente), hermeticamente fechada, previamente descrito por (NAGATO et al., 2009). Os animais do grupo GDCH e GDRH foram colocados na câmara no tempo zero (t=0) e oxigênio foi administrado durante 24 horas, com fluxo contínuo de 10 L/min. Os animais do GDC e GDR foram expostos ao ar ambiente às mesmas condições dos outros grupos experimentais. Trabalho desenvolvido por Nícia Pedreira Soares.(SOARES, 2015; SOARES et al., 2016).

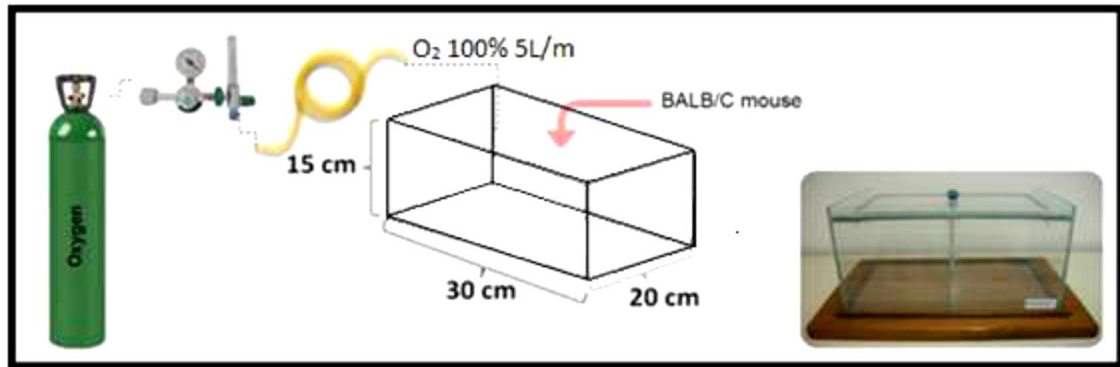


Figura 2. Esquema representativo da exposição ao oxigênio (O₂: oxigênio, L: litros, m: minutos, cm: centímetros). (NAGATO et al., 2009, 2012).

4.4. Eutanásia, processamento e homogeneizado do tecido hepático

Após o término do experimento todos os animais foram submetidos à anestesia com ketamina (130 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg) e o tórax aberto e foi realizada uma incisão no terceiro espaço intercostal para eutanásia por exsanguinação. Imediatamente após a eutanásia, o tecido hepático foi perfundido para remover o excesso de sangue. Assim, fragmentos de tecido hepático foram coletados, e fixados em formol tamponado 4% por 24-48 horas, e depois processados rotineiramente para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 4 micrômetros foram corados em Hematoxilina e Eosina para as análises histopatológicas e morfométricas.

Parte do tecido hepático foi mantida em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Estas amostras mantidas em gelo foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM mod. 243M, São Paulo, Brasil) a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer (-80°C).

4.5. Coloração com Hematoxilina e Eosina

Secções de fígado fixadas em lâminas histológicas de vidro foram desparafinadas em xilol e hidratadas em uma serie decrescente de álcoois (absoluto 90°, 80° e 70°). Após hidratação as lâminas foram coradas por 1 minuto e 30 segundos pela solução de Hematoxilina Harris, seguida de diferenciação em água corrente por 30 minutos. As lâminas foram posteriormente coradas pela solução de Eosina por 40 segundos, desidratadas em série crescente de álcoois (70°, 80°, 90° e absoluto) e montadas com lamínula e solução de Entellan.

4.6. Alterações histopatológicas do parênquima hepático

As análises histopatológicas foram realizadas morfológicamente, de maneira semi-quantitativa em microscopia óptica no aumento de 40x e de maneira quantitativa em técnicas de Morfometria e Densitometria Digital através da digitalização de 20 imagens de cada grupo de animais em microscópio LEICA DM5000B acoplado a câmera digital da LEICA DFC 300FX por intermédios do Software Leica Applications. Após obtenção das imagens na fotodocumentação utilizando o software Leica Application Suite V 3.6, elas foram analisadas utilizando a ferramenta na plataforma de morfometria/análise de imagem para obtenção de dados dos fenômenos degenerativos, tais como, inflamação, degeneração hidrópica, congestão sinusoidal, hiperemia, presença de granulomas e esteatose. Foi realizada a contagem de núcleos inflamatórios no parênquima hepático utilizando o software Leica Application Qwin V3. As análises de Esteatose foram realizadas através do programa ImageJ/Fiji 1.46r (desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland), com código-fonte livre, para quantificação de áreas com essa lesão. Foi realizada análise semi-quantitativa em todos os grupos para determinar a porcentagem de esteatose.

4.7. Biomarcadores de estresse e dano oxidativo

4.7.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método descrito por (BUEGE; 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 parênquima hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. 500 µL do sobrenadante do homogenato foram misturados com ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCL 0,25N) e TBA (1% em ácido) e colocados em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4° C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), seguindo a lei de Lambert Beer. Os resultados foram expressos em nmol/mg ptn (SOARES et al., 2016).

4.7.2. Atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi mensurada no homogeneizado tecidual de acordo com o método descrito por Marklund e Marklund. O método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol e MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, fragmentos de 50 mg de tecido foram homogeneizados com 500 μL tampão fosfato (pH 7,0), em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes.

A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, logo após 150 μL de DMSO foram adicionados para parar a reação. Posteriormente as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro de placas à 570 nm. Após a leitura da placa o valor de absorbância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorbância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco. O resultado foi representado em U/mg ptn.

4.7.3. Atividade de enzimas antioxidantes: Catalase (CAT)

A atividade de Catalase (CAT) foi mensurada de acordo com o método descrito por (AEBI, 1984) a partir do decréscimo de H_2O_2 a uma absorbância de 240 nm. O método se baseia na decomposição enzimática do H_2O_2 em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a preparação das amostras 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7,2) em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Foram utilizados os reagentes: tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliquotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 μL e 30 μL , respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μmol de hidrólise de H_2O_2 por minuto, por mL.

4.7.4. Proteína Carbonilada

Espécies reativas de oxigênio podem reagir com proteínas causando modificação oxidativa de proteínas e formação de compostos carbonílicos, que podem ser detectados por métodos sensíveis. Para a determinação de proteína carbonilada é utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). 500 μ L do homogeneizado hepático é colocado em tubos de polipropileno e adicionados 500 μ L de TCA 10%, mistura-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante é descartado e o precipitado é misturado com 500 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras são mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos são misturadas no vórtex. Ao final do período é acrescentado 500 μ L de TCA e as amostras são novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante é descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) é adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante é descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% mistura-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes são lidos no espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer, obtendo os resultados em mmol/mL.

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais utilizou-se o valor encontrado na análise de proteínas pelo método de (Bradford, 1976).

4.8. Análises estatísticas

As normalidades de todos os dados foram testadas por meio do teste de Kolmogorv Smirnov. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e avaliados pelo software GraphPad Prism 5.0. Foi utilizada análise de variância One way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e a diferença significativa foi considerada quando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises morfológicas e morfométricas do tecido hepático

A figura 3 apresenta imagens representativas das características morfológicas dos camundongos BALB/c submetidos a vários tratamentos. Como esperado, o grupo controle (GDC) que recebeu a dieta padrão e foram expostos ao ar ambiente, apresentou fígado com parênquima preservado apresentando hepatócitos e capilares sinusoidais com características usuais (figura 3A, tabela 1). Uma das lesões observadas com maior frequência neste estudo foi a degeneração hidrópica, também chamada de degeneração balonzante ou vacuolar, caracterizada pelo acúmulo citoplasmático de água e eletrólitos, deixando as células com citoplasma claro à coloração histológica, com aspecto granuloso e alteração da proporção citoplasma/núcleo (figuras 3A-F). Esta alteração, em estágios avançados, provoca compressão dos capilares sinusóides deixando-os pouco visíveis e dificultando a circulação sanguínea. A análise morfológica demonstrou degeneração hidrópica em todos os grupos (figura 3A-E), entretanto, em estágio mais avançado no grupo GDR (figura 3E).

O grupo que recebeu dieta padrão e foi submetido à hiperóxia (GDCH) apresentou em sua maioria, características morfológicas semelhantes ao grupo controle, entretanto, 50% destes animais apresentou algum nível de infiltrado inflamatório lobular e portal (figura 3B, tabela 1), 33% apresentou congestão sinusoidal (caracterizada pela retenção de sangue no interior dos capilares sinusóides) e 17% apresentou hiperemia (acúmulo de sangue por dilatação da veia porta e da veia centro-lobular) (tabela 1). Este resultado pode ser explicado pela duração de exposição à hiperóxia. De acordo com LOSADA et al. (2014), o tempo de exposição é crítico na prevalência de efeitos benéficos ou deletérios. HOVAGUIMIAN et al. (2013), em uma metanálise demonstraram que a hiperóxia (80% de O₂ inspirado) diminuiu o risco de infecção do local cirúrgico, tanto após a cirurgia eletiva quanto de emergência, sem um grande risco de atelectasia pós-operatória. Um outro estudo mostrou o efeito benéfico de hiperóxia em roedores (95% de O₂ inspirado) em que o volume de infarto foi reduzido em 58,6% e 64,4% com 16 e 24 horas de exposição, respectivamente. Além disso, a pontuação de déficit neurológico reduziu significativamente com 16 e 24 horas de exposição. (BIGDELI; KHOSHBATEN, 2008).

A dieta rica em carboidratos refinados (GDR) provocou muitas alterações do parênquima hepático características da DHGNA, corroborando com resultados postulados por AZZALINI et al, (2010) e ZEIN et al, (2006). O Acúmulo de lipídeos (esteatose microvesicular) foi observado em todos os animais do grupo GDR e em grande proporção (Figura 3C, D), enquanto apresentou-se em menor proporção nos grupos GDC, GDCH e GDRH. Além disso, as análises morfológicas do tecido hepático dos animais GDR evidenciaram as seguintes lesões: 67% dos animais apresentou congestão de capilares sinusóides e hiperemia, 83% apresentou processo inflamatório lobular e portal e 17% apresentou reação granulomatosa. Confirmando a análise morfológica, a quantificação de esteatose detectou maior percentual no grupo GDR quando comparado aos demais grupos (figura 4). KRISTIANSEN et al, (2016) mostraram que uma dieta com alto teor de carboidratos refinados gera um potencial evolutivo da DHGNA como esteatohepatite e fibrose.

A exposição à hiperóxia em animais submetidos à dieta rica em carboidratos (GDRH) reduziu as alterações da arquitetura tecidual provocadas por essa dieta, assim, a congestão sinusoidal e a hiperemia foram reduzidas para 17% e o infiltrado inflamatório para 50%, atingindo porcentagens semelhantes aos animais do grupo GDCH (tabela 1). Assim, apesar do grande tempo de exposição à hiperóxia, seu efeito protetor pode ser notado em nosso experimento. Estes dados sugerem mais estudos para uma definição dos tempos de exposição em terapias futuras.

Tabela 1: Frequência de lesões observadas em microscopia óptica no fígado de camundongos BALB/c

Lesão encontrada	GDC	GDCH	GDR	GDRH
	N (%) N=6	N (%) N=6	N (%) N=6	N (%) N=6
Degeneração hidrópica	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
Congestão sinusoidal	0 (0)	2 (33)	4 (67)	1 (17)
Hiperemia	0 (0)	1 (17)	4 (67)	1 (17)
Hemorragia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Infiltrado inflamatório lobular ou portal	0 (0)	3 (50)	5 (83)	3 (50)
Granuloma	0 (0)	0 (0)	1 (17)	0 (0)

(GDC) animais com dieta padrão e expostos ao ar ambiente, (GDCH) animais com dieta padrão e expostos à hiperóxia, (GDR) animais suplementados com dieta rica em carboidratos e expostos ao ar ambiente, (GDRH) animais suplementados com dieta rica em carboidratos e expostos à hiperóxia.

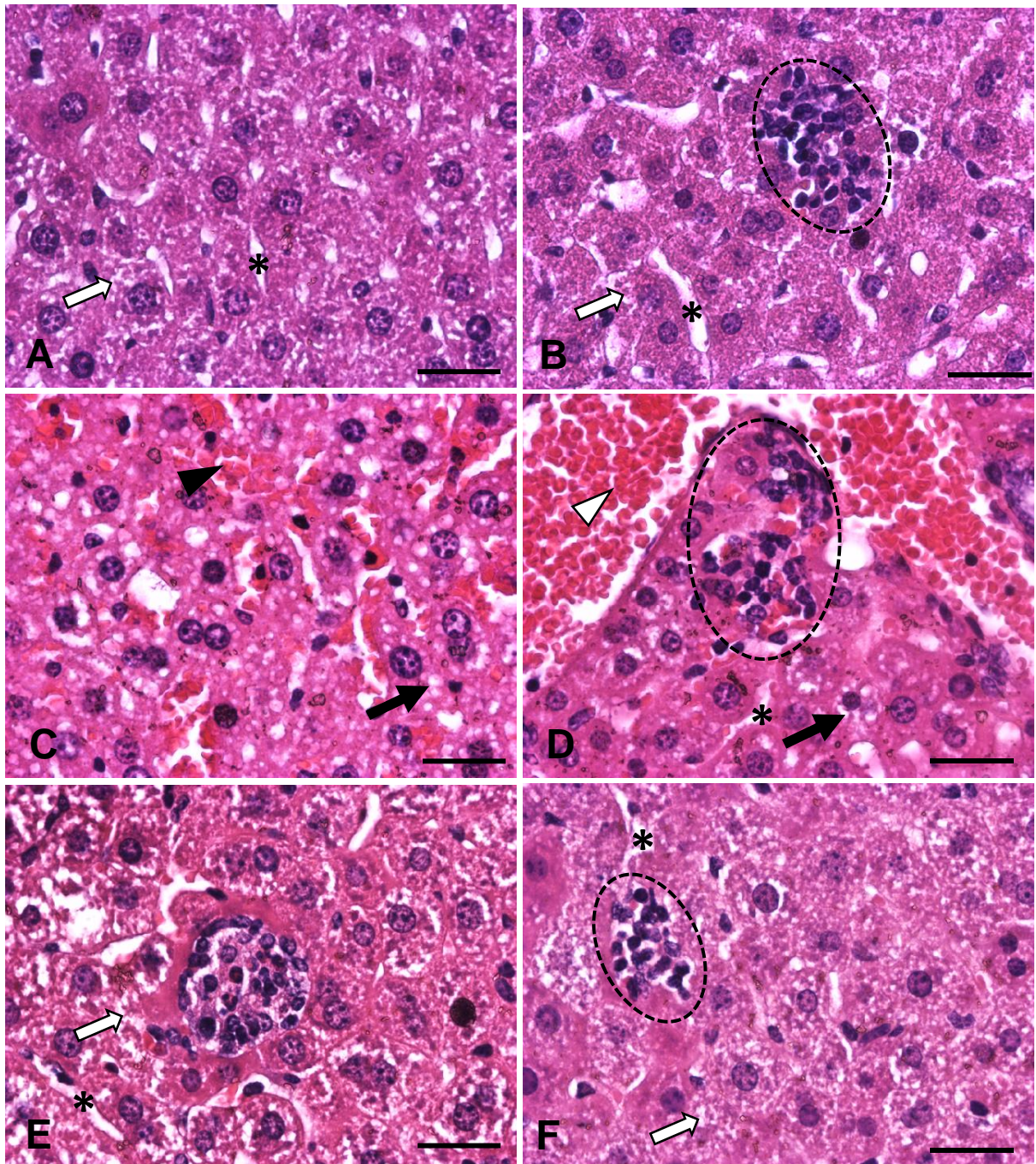


Figura 3: Características histopatológicas dos fígados de camundongos BALB/c com dieta padrão e expostos ao ar ambiente (GDC) (A), grupo com dieta padrão e exposto à hiperóxia (GDCH) (B), grupo que recebeu uma dieta rica em carboidratos (GDR) (C, D, E) e grupo que recebeu uma dieta rica em carboidratos e exposto à hiperóxia (GDRH) (F). **A**) Fígado com parênquima preservado, apresentando degeneração hidrópica em pequena proporção (seta branca). Capilares sinusóides (*). **B**) Parênquima hepático com características morfológicas semelhantes ao controle, exceto pela presença de infiltrado inflamatório (círculo pontilhado). Degeneração hidrópica (seta branca). Capilares sinusóides (*). **C e D**) Observe a presença de aspectos morfológicos de esteatose em todo do parênquima hepático (seta preta), capilares congestionados (cabeça de seta preta) e hiperemia (cabeça de seta branca). Observe ainda infiltrado inflamatório contornado pelo círculo pontilhado e a presença de sinusóides preservados (*). **E**) No centro da imagem é visualizado um granuloma, presente em um animal suplementado com dieta rica em carboidratos. Degeneração hidrópica (seta branca). Capilares sinusóides (*). **F**) A hiperóxia promoveu diminuição dos processos degenerativos provocados pela dieta rica em carboidratos. Degeneração hidrópica (seta branca). Capilares sinusóides (*). Infiltrado inflamatório (círculo pontilhado). Coloração: Hematoxilina-eosina. Barra = 100 μ m.

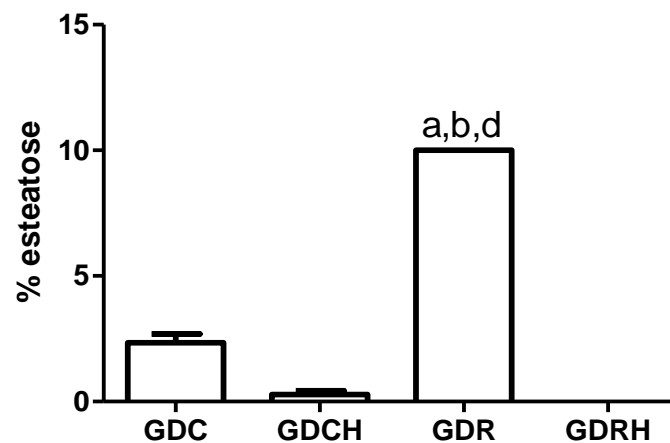


Figura 4: Análise morfométrica de esteatose em camundongos BALB/c. GDC: Grupo Dieta Controle; GDCH: Grupo Dieta Controle + Hiperóxia; GDR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GDRH: Grupo Dieta com alto teor de carboidratos refinados + Hiperóxia. O GDR apresentou maior percentual de esteatose quando comparado ao GDC (a), GDCH (b), GDR (c), GDRH (d). Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Os achados morfológicos em relação ao infiltrado inflamatório foram confirmados por meio de uma análise semi-quantitativa do número de núcleos inflamatórios utilizando o software Leica Application Qwin V3. Observou-se que o GDC apresentou menor percentual de células inflamatórias em relação aos outros grupos (figura 5), dado que caracteriza um estresse oxidativo causado tanto pela dieta com alto teor de carboidratos refinados, quanto pela hiperóxia.

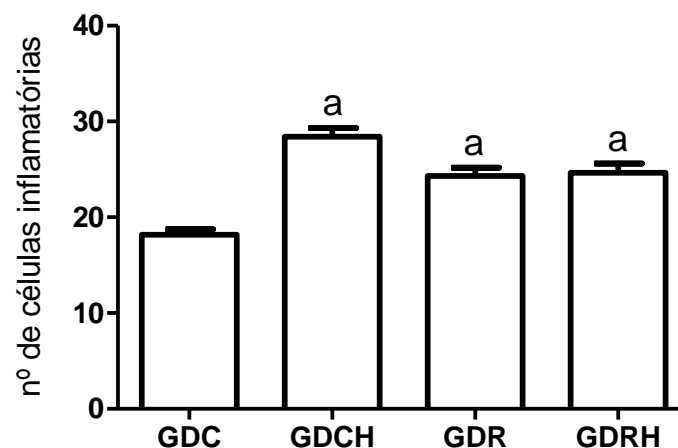


Figura 5: Número de células inflamatórias no parênquima hepático. GDC: Grupo Dieta Controle; GDCH: Grupo Dieta Controle + Hiperóxia; GDR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GDRH: Grupo Dieta Com alto teor de carboidratos refinados + Hiperóxia. A letra (a) representa diferença significativa entre o GDC quando comparado aos outros grupos. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Estudos têm demonstrado que tanto a obesidade quanto a hiperóxia provocam processos inflamatórios (BONOMINI; RODELLA; REZZANI, 2015). É bem evidente em nossos experimentos o efeito da hiperóxia e da dieta com alto teor de carboidratos refinados em promoverem inflamação. A inflamação é uma resposta imune defensiva do organismo e as espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas de sinalização chave que desempenham um papel importante na progressão de distúrbios inflamatórios.

Além disso, as observações experimentais e clínicas indicam o estresse oxidativo como um mecanismo importante na síndrome metabólica associada à obesidade, no desenvolvimento de diabetes e suas complicações e em condições como a esteatohepatite não alcoólica (NASH) (FURUKAWA et al., 2004). O oxigênio é usado na medicina moderna como um tratamento para várias doenças com componentes inflamatórios. Assim, a oxigenação hiperbárica demonstrou efeitos benéficos, além de melhorar a oxigenação tecidual local, na promoção da angiogênese, na cicatrização de feridas e na neuroproteção. (HUANG; OBENAU, 2011; ROTH et al., 2011; KAUR et al., 2012; MA et al., 2013). No entanto, uma exposição excessiva à hiperóxia pode levar a efeitos deletérios tais como estresse oxidativo, edema pulmonar e inflamação (KALLET; MATTHAY, 2013; EYNAN et al., 2014). O aumento de células inflamatórias no GCDH em relação ao grupo controle pode ser explicado pela produção aumentada das espécies reativas de oxigênio que iniciam um papel importante na lesão do fígado durante a exposição à hiperóxia, levando ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante.

5.2. Biomarcadores de estresse e dano oxidativo

Um sistema antioxidante complexo foi desenvolvido em mamíferos para aliviar o estresse oxidativo, assim, no presente trabalho foi determinada a atividade das principais enzimas constituintes do sistema de defesa antioxidante com o objetivo de investigar o desequilíbrio redox induzido pela dieta rica em carboidratos e o efeito da hiperóxia sobre esse desequilíbrio. A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. No presente estudo, a atividade de SOD foi maior em GDCH quando comparado aos grupos GDC e GDR (tabela 2). Além disso, a atividade de SOD foi maior no grupo GDRH em relação ao GDC (tabela 2). Estes resultados indicam a ativação do sistema antioxidante nos grupos suplementados com oxigênio, para promover um equilíbrio

dinâmico entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, aliviando o estresse oxidativo.

Tabela 2: Biomarcadores do estresse oxidativo

	GDC	GDCH	GDR	GDRH
SOD (U/mg ptn)	91,44 ± 9,16	237,7 ± 30,45 ^{a,b}	143,1 ± 13,02	179,9 ± 16,92 ^a
CAT (U/mg ptn)	5,166 ± 0,99	2,490 ± 0,41 ^a	2,444 ± 0,19 ^a	2,988 ± 0,30 ^a
TBARS (nmol/mg ptn)	15,24 ± 2,45	6,59 ± 0,99	11,08 ± 0,54	17,19 ± 4,18

(a) representa diferença significativa quando comparado ao GDC. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo GDR. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por One-way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). GDC: Grupo Dieta Controle; GDCH: Grupo Dieta Controle + Hiperóxia; GDR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GDRH: Grupo Dieta Com alto teor de carboidratos refinados + Hiperóxia.

A enzima catalase é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos, responsável por impedir o acúmulo de H_2O_2 , convertendo-o em duas moléculas de água. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio. O acúmulo de H_2O_2 possibilita, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxila (OH) (BARBOSA et al., 2010), que pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente aminoácidos como a cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina que podem gerar danos em proteínas e como consequência perda da atividade enzimática (BERGER et al., 1999). Uma vez que a CAT é formada por aminoácidos, em uma situação em que a defesa da enzima CAT esteja prejudicada, haverá como consequência um acúmulo de H_2O_2 , o que levará uma maior produção do radical OH e um maior ataque a essa enzima, o que intensifica danos. No presente trabalho, a atividade da enzima catalase foi menor nos grupos GDCH, GDR e GDRH quando comparado ao GDC (tabela 2). Este resultado está de acordo com Furukawa et al. (2004) que descreveram a relação direta entre o aumento de ERO no tecido adiposo de camundongos obesos com o aumento na expressão de NADPH oxidase, e diminuição da expressão de enzima antioxidante CAT. Podemos inferir que a menor atividade de CAT nos grupos submetidos a dieta com alto teor de carboidratos refinados e expostos à hiperóxia pode ser explicado pela ativação do sistema glutaciona em reduzir as espécies reativas de oxigênio presentes no fígado, visto que esse órgão é um dos principais produtores de glutaciona no organismo. (CHEN et al., 2013). Nossos resultados sugerem que a dieta rica em carboidratos refinados e a exposição à hiperóxia levam a um aporte de espécies reativas, mas tal aporte não foi suficiente para estabelecer o equilíbrio redox que pudesse sustentar a alta

atividade da enzima catalase, sendo assim o sistema tende a um equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes.

Não observamos diferença significativa na peroxidação lipídica de fígados entre os grupos (tabela 2). Na dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos da peroxidação lipídica reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando malondialdeído dessa forma, a peroxidação lipídica é usada como um marcador de dano celular (TSIKAS, 2017). Nesse estudo, as concentrações de ERO não ultrapassaram a capacidade antioxidante do organismo assim não houve um dano oxidativo significativo por isso na peroxidação lipídica não observamos uma diferença significativa entre os grupos.

6. Conclusões

- A dieta com alto teor de carboidratos refinados promoveu injúrias na arquitetura hepática características da DHGNA.
- A hiperóxia isoladamente promoveu lesões na arquitetura hepática em menor grau que a dieta rica em carboidratos refinados.
- A exposição à hiperóxia foi capaz de amenizar parcialmente as lesões provocadas pela dieta rica em carboidratos.

Assim, podemos inferir que a hiperóxia pode ter papel de proteção na DHGNA, entretanto, estes dados sugerem mais estudos para uma definição dos tempos de exposição e concentração de oxigênio que devem ser utilizados para que os efeitos benéficos se sobressaiam aos efeitos deletérios.

7. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. B. T.-M. IN E. [13] Catalase in vitro. In: **Oxygen Radicals in Biological Systems**, v. 105p. 121–126, 1984.
- AMERICAN GASTROENTEROLOGICAL ASSOCIATION American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Nonalcoholic Fatty Liver Disease When Should the Presence of NAFLD Be Suspected? **Gastroenterology**, v. 123, n. 5, p. 1702–1704, nov. 2002.
- ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2–11, fev. 2008.
- ARTEEL, G. E. et al. Chronic enteral ethanol treatment causes hypoxia in rat liver tissue in vivo. **Hepatology**, v. 25, n. 4, p. 920–926, apr. 1997.
- AZZALINI, L. et al. Cigarette smoking exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in obese rats. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 5, p. 1567–1576, maio 2010.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, aug. 2010.
- BERGER, P. et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 433–441, fev. 1999.
- BERNACCHI, A. et al. Protection of hepatocytes with hyperoxia against carbon tetrachloride-induced injury. **Toxicologic Pathology**, v. 12, n. 4, p. 315–323, jun. 1984.
- BESKE, S. D. et al. Reduced cardiovagal baroreflex gain in visceral obesity: Implications for the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 2 51-2, p. 630–635, fev. 2002.
- BHASKARAN, K. et al. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 5.24 million UK adults. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 755–765, aug. 2014.
- BIGDELI, M.; KHOSHBATEN, A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappa B. **Neuroscience**, v. 153, n. 3, p. 671–678, 1 jun. 2008.
- BITTERMAN, H. Bench-to-bedside review: Oxygen as a drug. **Critical Care**, v. 13, n. 1, p. 205, fev. 2009.
- BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. **Aging Dis**, v. 6, n. 2, p. 109–121, mar. 2015.
- BOSCH, F. X. et al. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5 SUPPL., p. 5–16, nov. 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–54, May 7, 1976.

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- BYRNE, C. D. Hypoxia and non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical Science**, v. 118, n. 6, p. 397–400, dec. 2010.
- CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277–2286, ago. 2005.
- CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 60, p. 38–44, out. 2013.
- CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 6–10, mar. 2019.
- CINTI, S. The adipose organ at a glance. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 588–594, sep. 2012.
- COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995**. Washington, DC: The National Academies Press, 1995.
- DIEMEN, V. VON et al. Experimental model to induce obesity in rats 1 Modelo experimental para induzir obesidade em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425–429, dec. 2006.
- ERCIN, C. N. et al. The effect of iNOS inhibitors and hyperbaric oxygen treatment in a rat model of experimental colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 54, n. 1, p. 75–79, jan. 2009.
- EYNAN, M. et al. A comparison of factors involved in the development of central nervous system and pulmonary oxygen toxicity in the rat. **Brain research**, v. 1574, p. 77–83, jul. 2014.
- FRENCH, S. W. The role of hypoxia in the pathogenesis of alcoholic liver disease. **Hepatology Research**, v. 29, n. 2, p. 69–74, 1 jun. 2004.
- FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 340–342, maio 2009.
- FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1507–1516, jun. 2003.
- FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, dec 2004.
- Global Burden of Disease Collaborative Network. **Global Burden of Disease Study 2015 (GBD 2015) Obesity and Overweight Prevalence 1980-2015**. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2017.
- HALLIWELL, B. Current status review: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British Journal of**

Experimental Pathology, v. 70, n. 6, p. 737–757, dec. 1989.

HOSOGAI, N. et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 901–911, abr. 2007.

HOVAGUIMIAN, F. et al. Effect of intraoperative high inspired oxygen fraction on surgical site infection, postoperative nausea and vomiting, and pulmonary function: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Anesthesiology**, v. 119, n. 2, p. 303–316, ago. 2013.

HUANG, L.; OBENAU, A. Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury. **Medical gas research**, v. 1, n. 1, p. 21, 6 set. 2011.

JAMES, P. T. et al. The worldwide obesity epidemic. **Obesity research**, v. 9 Suppl 4, n. S11, p. 228S–233S, nov. 2001.

JUGE-AUBRY, C. E.; MEIER, C. A.; HENRICHOT, E. Adipose tissue : a regulator of inflammation. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 547–566, dec. 2005.

JUNGERMANN, K.; KIETZMANN, T. Oxygen: Modulator of metabolic zonation and disease of the liver. **Hepatology**, v. 31, n. 2, p. 255–260, feb. 2000.

KALLET, R. H.; MATTHAY, M. A. Hyperoxic acute lung injury. **Respiratory care**, v. 58, n. 1, p. 123–141, jan. 2013.

KAUR, S. et al. Evaluation of the efficacy of hyperbaric oxygen therapy in the management of chronic nonhealing ulcer and role of periwound transcutaneous oximetry as a predictor of wound healing response: A randomized prospective controlled trial. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 70–75, jan. 2012.

KAWASAKI, N. et al. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 1–7, nov. 2012.

KONDO, K. et al. Fenofibrate, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonist, Improves Hepatic Microcirculatory Patency and Oxygen Availability in a High-Fat-Diet-Induced Fatty Liver in Mice. **Oxygen Transport to Tissue XXXI**, v. 662, p. 77–82, jan. 2010.

KREIMER, F. et al. Preliminary results of hyperbaric oxygen therapy on patients on the waiting list for liver transplantation. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 1, p. 48–51, mar. 2011.

KRISTIANSEN, M. N. B. et al. Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. **World journal of hepatology**, v. 8, n. 16, p. 673–684, jun. 2016.

LEE, S. H.; DO, S. I.; KIM, H. S. Hyperoxia accelerates progression of hepatic fibrosis by up-regulation of transforming growth factor- β expression. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 11, p. 3011–3017, mar. 2014.

LOSADA, D. M. et al. Should preconditioning hyperbaric oxygenation protect the liver against ischemia-reperfusion injury? An Experimental study in a rat model. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 1, p. 56–62, Jan-Feb. 2014.

MA, L. et al. A prospective, randomized, controlled study of hyperbaric oxygen therapy: effects on healing and oxidative stress of ulcer tissue in patients with a diabetic foot ulcer. **Ostomy/wound management**, v. 59, n. 3, p. 18–24, mar. 2013.

MANTENA, S. K. et al. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 183–193, jan. 2009.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, set. 1974.

MARTINS CHAVES, M. et al. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 119, n. 1–2, p. 1–8, nov. 2000.

MENEZES-GARCIA, Z. et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. **Obesity**, v. 22, n. 3, p. 663–672, mar. 2014.

NAGATO, A. et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in wistar rats. **Experimental Lung Research**, v. 35, n. 8, p. 713–728, nov. 2009.

NAGATO, A. C. et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 269–278, aug. 2012.

NASRIN, N. et al. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 31995–32002, out. 2010.

NATHAN, C. Immunology: Oxygen and the inflammatory cell. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 675–676, abr. 2003.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M. Erratum: Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 (The Lancet (2014) 384 (766–81)). **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 746, aug. 2014.

NOROUZIRAD, R.; GONZÁLEZ-MUNIESA, P.; GHASEMI, A. Hypoxia in Obesity and Diabetes: Potential Therapeutic Effects of Hyperoxia and Nitrate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–14, may. 2017.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 1–11, sep. 2013.

PAGE, J. M.; HARRISON, S. A. NASH and HCC. **Clinics in Liver Disease**, v. 13, n. 4, p. 631–647, nov. 2009.

QUINTERO, P. et al. Impact of oxygen availability on body weight management. **Medical Hypotheses**, v. 74, n. 5, p. 901–907, may. 2010.

RADIN, M. J.; SHARKEY, L. C.; HOLYCROSS, B. J. Adipokines: a review of biological and analytical principles and an update in dogs, cats, and horses. **Veterinary clinical**

pathology, v. 38, n. 2, p. 136–156, jun. 2009.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994.

ROTH, V. et al. Stimulating angiogenesis by hyperbaric oxygen in an isolated tissue construct. **Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc**, v. 38, n. 6, p. 509–514, nov. 2011.

SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 349, p. g4596–g4596, 29 jul. 2014.

SOARES, N. P. **Efeitos da associação entre uma dieta rica em carboidratos refinados e à hiperóxia sobre o desequilíbrio redox e a inflamação em camundongos**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

SOARES, N. P. et al. The effects of the combination of a refined carbohydrate diet and exposure to Hyperoxia in Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 2, p. 1-11, out. 2016.

SUZUKI, T. et al. Hypoxia and fatty liver. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 41, p. 15087–15097, nov. 2014.

SWINBURN, B. A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **Lancet (London, England)**, v. 378, n. 9793, p. 804–814, ago. 2011.

TIBBLES, P. M.; EDELSBERG, J. S. Hyperbaric-oxygen therapy. **The New England journal of medicine**, v. 334, n. 25, p. 1642–1648, jun. 1996.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Analytical biochemistry**, v. 524, p. 13–30, maio 2017.

VALENÇA, S. D. S. et al. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 655–662, dec. 2007.

VIDELA, L.; BERNSTEIN, J.; ISRAEL, Y. Metabolic alterations produced in the liver by chronic ethanol administration. Increased oxidative capacity. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 2, p. 507–514, jun. 1973.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, dez. 2003.

WHO. **Obesity and overweight**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Digestive diseases and sciences**, v. 54, n. 9, p. 1847–1856, set. 2009.

YORK, D. A. Lessons from animal models of obesity. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 781–800, dez. 1996.

YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors

and prevention. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 11–20, sep. 2017.

ZANGL, Q. et al. Postoperative hyperoxia (60%) worsens hepatic injury in Mice. **Anesthesiology**, v. 121, n. 6, p. 1217–1225, 2014.

ZEIN, C. O. et al. Smoking and increased severity of hepatic fibrosis in primary biliary cirrhosis: A cross validated retrospective assessment. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 44, n. 6, p. 1564–1571, dez. 2006.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 2013-58 relativo ao projeto intitulado **A influência da obesidade sobre a resposta inflamatória pulmonar de camundongos expostos a hiperóxia**, que tem como responsável o Prof. Dr. Frank Silva Bezerra, foi aprovado na reunião da CEUA – UFOP em 21 de março de 2014.

Este certificado expira-se em **fevereiro de 2018**.

Ouro Preto 05 de maio de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima
Wanderson Geraldo de Lima

CEUA-UFOP