



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP

ESCOLA DE NUTRIÇÃO



Geovanna Cristina Pires

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS PERFIS METABÓLICO E REDOX NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA METABÓLICA (DHGM)
EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Ouro Preto, MG

2025

Geovanna Cristina Pires

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DOS PERFIS METABÓLICO E REDOX NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA METABÓLICA (DHGM)
EM CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Nutrição da Universidade Federal de
Ouro Preto como requisito para a formação
superior em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dr^a. Daniela Caldeira Costa
Calsavara

Coorientadora: Dr^a. Natália Pereira da Silva
Araújo

Ouro Preto, MG

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P667a Pires, Geovanna Cristina.

Avaliação temporal dos perfis metabólico e redox na progressão da doença hepática gordurosa metabólica (DHGM) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. [manuscrito] / Geovanna Cristina Pires. - 2025.

68 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara.

Coorientadora: Dra. Natália Pereira da Silva Araújo.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Dieta hiperlipídica. 2. Fígado - Doenças. 3. Esteatose hepática. 4. Estresse oxidativo. I. Calsavara, Daniela Caldeira Costa. II. Araújo, Natália Pereira da Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 612.397: 616.36

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



FOLHA DE APROVAÇÃO

Geovanna Cristina Pires

Avaliação do perfil metabólico e redox na progressão da doença hepática gordurosa metabólica (DHGM) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de nutricionista.

Aprovada em 01 de agosto de 2025

Membros da banca

Dra Daniela Caldeira Costa Calsavara - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra Natália Pereira da Silva Araújo - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra Renata Rebeca Pereira - Universidade Federal de Ouro Preto
Msc. Pedro Alves Machado Junior - Universidade Federal de Ouro Preto

Daniela Caldeira Costa Calsavara, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 02/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Caldeira Costa Calsavara, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/09/2025, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0971322** e o código CRC **38D6FE9C**.

Dedico este trabalho à minha mãe, que abriu mão dos seus sonhos para que um dia eu pudesse realizar os meus. Dedico também ao meu pai, que trabalhou incansavelmente para que a realização dos meus sonhos fosse possível. E ao meu irmão que sempre torceu pelas minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, Ele sonhou tudo isso para mim antes que eu mesma pudesse sonhar. Foi Ele que me guiou, fortaleceu, capacitou e me sustentou para que eu chegasse até aqui. Foi Ele que amparou meus pais, que fez com que um dia eu pudesse estar escrevendo esse texto. Sem Ele nada disso seria possível.

Quero agradecer também à minha mãe, Vânia Pires, que deixou de viver seus próprios sonhos para que eu e meu irmão pudéssemos buscar os nossos, que dedicou cada segundo da sua vida para cuidar integralmente de nós. Ela que, mesmo diante das dificuldades, nunca deixou com que eu desistisse de buscar o meu futuro, que na sua sensibilidade, buscou ser meu suporte e sustento quando tudo parecia ser impossível de vencer. Ao meu pai, Hélio Pires, que dedicou a vida ao trabalho e ao sustento da nossa família, que nunca deixou com que nada faltasse e que sempre deu o seu melhor para que esse sonho pudesse ser concretizado, mesmo precisando abrir mão ou adiar os seus próprios sonhos. Ao meu irmão, Jean Pires, que sempre esteve na primeira fileira torcendo por mim.

Ao meu namorado, Bruno Vieira, que acordou todos os dias às cinco da manhã comigo, que esperou que eu acabasse de estudar tarde da noite para não me deixar sozinha, que foi paciente ao escutar cada matéria que eu estudava para as provas, mesmo sem entender uma palavra e, que sonhou todos os meus sonhos comigo e nunca deixou que eu desistisse.

Aos meus amigos que a ENUT me deu, Maria Larisa, Maria Gabriela, Veronica, Lorena, Clara, Caroline e João Victor, que foram minha companhia em cada aventura que enfrentamos durante o curso. Aos meus amigos itabiritenses, Flavinha, Hilary, Izabela, Dantas, Vini, João, Richard e Dudu, que mais que minhas companhias de estrada, tornaram o início e o fim do meu dia mais leves e engraçados. Em especial, ao Adilson e a todos os motoristas que fizeram esses 40km diariamente com carinho e paciência, permitindo com que pudéssemos ir e voltar com segurança. Aos meus mestres que se dedicaram em nos formar bons nutricionistas, principalmente, Alessandra, Laser, Silvana, Sônia e Tereza que sempre abriram portas e oportunidades para mim.

Deixo a minha gratidão à minha orientadora Daniela Caldeira, por abrir as portas do LBM e acreditar no meu potencial. A Natália Araújo, Renata Rebeca, Maria Laura, Allan Gonçalves, Júlio César, Pedro Alves e Isabela Jesus por permitirem que eu dividisse a bancada e aprendesse um pouquinho com a grande experiência de vocês. As minhas companheiras de Iniciação Científica Amanda, Lucimar e a minha fiel duplinha Sara, por dividirem cada aprendizado e desafio comigo, tornando tudo mais leve e agradável.

"Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos ao dar."

- Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), agora chamada de doença hepática gordurosa metabólica (DHGM), é uma das principais causas de doença hepática crônica. Sua prevalência tem aumentado significativamente ao longo dos anos, indicando a disfunção metabólica como um fator contribuinte para essa condição. Mudanças nos padrões alimentares e na qualidade nutricional das refeições têm sido observadas, especialmente o consumo excessivo de gorduras saturadas. Neste contexto, sabe-se que a duração do consumo de dietas hiperlipídicas ricas em gorduras saturadas ao longo da vida pode influenciar os desfechos da resposta metabólica e oxidativa no fígado de maneira diferenciada, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento da DHGM, induzindo modificações oxidativas em macromoléculas celulares, resultando em danos hepáticos. Assim, a hipótese desta pesquisa é de que a duração da exposição a uma dieta hiperlipídica rica em banha de porco poderá afetar de forma distinta os mediadores metabólicos e o perfil redox hepático em camundongos, sendo que a exposição prolongada poderá agravar essas alterações. Dessa forma, este estudo pré-clínico tem como objetivo avaliar o impacto da dieta hiperlipídica nos parâmetros metabólicos séricos (glicose, insulina, colesterol total e triglicérides), no perfil lipídico hepático, nos biomarcadores de perfil redox hepático (SOD, CAT, GSH, TBARS e proteína carbonilada) e elucidar essas alterações no agravamento da DHGM. Para cumprir os objetivos propostos, foram utilizados 32 camundongos C57Bl/6 machos, recém desmamados, aleatoriamente distribuídos em dois grupos: Grupo Controle (C), que recebeu dieta padrão AIN-93M; Grupo Dieta Hiperlipídica (DH), que recebeu dieta com 30% de fonte lipídica proveniente de banha de porco. Metade dos animais foram eutanasiados após 8 semanas de exposição à dieta (com o intuito de avaliar as alterações hepáticas iniciais) e a outra metade após 16 semanas (com o intuito de avaliar as alterações hepáticas crônicas). Soro e fígado foram coletados para as análises dos mediadores metabólicos e biomarcadores do perfil redox. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP), sob o número de protocolo 9100220322. A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.0, pela análise ANOVA TWO WAY, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que a dieta hiperlipídica induziu a hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipercolesterolemia quando consumida de forma crônica, apesar de não causar alterações na glicemia e reduzir os triglicérides séricos, quando comparada ao grupo controle e ao menor tempo de exposição. Houve também aumento significativo na deposição de lipídios no fígado no grupo DH em comparação ao menor tempo de exposição e ao grupo controle. Em relação ao perfil redox hepático, não houve alterações significativas na atividade das enzimas antioxidantes e nos danos hepáticos mediados por oxidação em comparação ao grupo controle e ao período de ingestão das dietas. Pode-se concluir, portanto, que a dieta hiperlipídica induziu alterações metabólicas séricas e aumento do depósito de gorduras no fígado, principalmente no tempo de dezesseis semanas quando comparada à dieta controle e ao tempo de oito semanas. No entanto, mais experimentos são necessários para observar melhor as alterações no perfil redox hepático.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; doença hepática gordurosa metabólica; esteatose hepática; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), now referred to as metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD), is one of the leading causes of chronic liver disease. Its prevalence has increased significantly over the years, highlighting metabolic dysfunction as a contributing factor. Changes in eating patterns and the nutritional quality of meals have been observed, particularly the excessive intake of saturated fats. In this context, it is well established that the duration of consumption of high-fat diets rich in saturated fats throughout life can differentially influence metabolic and oxidative responses in the liver, contributing to the development and progression of MAFLD by inducing oxidative modifications in cellular macromolecules, resulting in liver damage. Based on this, the hypothesis of this study is that the duration of exposure to a high-fat diet rich in pork lard may differentially affect metabolic mediators and the hepatic redox profile in mice, with prolonged exposure potentially exacerbating these effects. Therefore, this preclinical study aims to evaluate the impact of a high-fat diet on serum metabolic parameters (glucose, insulin, total cholesterol, and triglycerides), hepatic lipid profile, and hepatic oxidative stress markers (SOD, CAT, GSH, TBARS, and protein carbonyls), and to elucidate changes in the redox profile during MAFLD progression. To achieve these objectives, 32 newly weaned male C57Bl/6 mice were randomly assigned to two groups: a Control Group (C), which received the standard AIN-93M diet, and a High-Fat Diet Group (HF), which received a diet containing 30% lipid content derived from pork lard. Half of the animals were euthanized after 8 weeks of diet exposure (to assess early hepatic changes), and the other half after 16 weeks (to assess chronic changes). Serum and liver samples were collected for analysis of metabolic mediators and oxidative stress biomarkers. All experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA/UFOP) under protocol number 9100220322. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software, with two-way ANOVA used to assess significance, considering $p < 0.05$ as statistically significant. The results showed that chronic consumption of the high-fat diet induced hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypercholesterolemia, despite not causing significant changes in blood glucose levels and leading to a reduction in triglycerides compared to the control group and the shorter exposure period. There was also a significant increase in hepatic lipid deposition compared to both the shorter exposure period and the control group. Regarding the hepatic oxidative profile, no significant changes were observed in antioxidant enzyme activities or oxidative damage markers compared to the control group or between the different diet exposure durations. In conclusion, the high-fat diet induced alterations in serum metabolic parameters and increased fat accumulation in the liver, particularly after sixteen weeks compared to the control diet and the eight-week period. However, further studies are needed to better understand the potential changes in the hepatic redox profile. **Keywords:** high-fat diet; metabolic-associated fatty liver disease; hepatic steatosis; oxidative stress.

Keywords: high-fat diet; metabolic-associated fatty liver disease; hepatic steatosis; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Critérios diagnósticos da DHGM

Figura 2 - Efeitos da Dieta Hiperlipídica no Desequilíbrio Redox e na Progressão da Doença Hepática Gordurosa Metabólica (DHGM)

Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental

Figura 4 - Avaliação do perfil lipídico no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

Figura 5 - Avaliação do perfil antioxidante no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

Figura 6 - Avaliação dos biomarcadores de dano mediado por oxidação no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Caracterização das dietas

QUADRO 2 - Avaliação do perfil murinométrico e dos parâmetros de consumo alimentar em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

QUADRO 3 - Avaliação dos parâmetros metabólitos séricos em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

QUADRO 4 - Resumo dos resultados obtidos em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil -CoA carboxilase
AGS	Ácidos graxos saturados
ALA	Ácido α -linolênico
apoB100	Apolipoproteína B100
ATP	Adenosina trifosfato
C	Controle
CAC	Ciclo do ácido cítrico
CAT	Catalase
CEA	Coefficiente de eficiência alimentar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGPCC	Coefficiente de ganho de peso por consumo calórico
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DH	Dieta hiperlipídica
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHGM	Doença hepática gordurosa metabólica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHNA	Esteato - hepatite não alcoólica
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Ácido graxo sintase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IsoPS	Isoprostanos

LA	Ácido linoleico
LBM	Laboratório de Bioquímica Metabólica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOOH	Hidroperóxido lipídicos
LPS	Lipopolissacarídeo
MA	Ácido mirístico
MDA	Malondialdeído
MMP	Metaloproteinases
mPTP	Poros de permeabilidade mitocondrial
MTTP	Proteína de transferência de triglicerídeos microssomais
MUFA	Ácido graxo monoinsaturado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NLRs	Nucleotídeos citoplasmáticos
NLRP3	Proteína 3 do receptor semelhante a NOD
NPs	Neuroprostranos
O₂	Oxigênio
OA	Ácido oleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	ácido palmítico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
RE	Retículo endoplasmático
SA	ácido esteárico
SCD1	Esteroil -CoA dessaturase-1
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
TAG	Triacilgliceróis
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TLRs	Toll-like ligados à membranas
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Dietas ocidentais e sua relação com doenças crônicas não transmissíveis.....	15
2.2 Metabolismo de lipídios e a produção de espécies reativas de oxigênio.....	16
2.3 Doença Hepática Gordurosa Metabólica (DHGM) associada ao consumo elevado de lipídios na dieta.....	18
2.4 Estresse Oxidativo induzido pela dieta hiperlipídica e biomarcadores de dano mediado pela oxidação.....	21
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Cuidados éticos.....	27
4.2 Animais e delineamento experimental.....	27
4.3 Dados murinométricos e parâmetros de consumo alimentar.....	28
4.3.1 Ganho de Peso Total, Índice de Adiposidade, Coeficiente de eficiência alimentar.....	28
4.4 Dosagens Bioquímicas séricas.....	29
4.4.1 Glicose, Triglicérides e Colesterol Total.....	29
4.4.2. Insulina.....	31
4.5 Perfil lipídico hepático.....	32
4.5.1. Extração e quantificação de lipídios no fígado.....	32
4.5.2. Colesterol Total e Triacilgliceróis Hepáticos.....	32
4.6 Biomarcadores de dano oxidativo no fígado.....	33
4.6.1. Proteína Carbonilada.....	33
4.6.2. Ácido Tiobarbitúrico (TBARs).....	34
4.7 Perfil antioxidante hepático.....	34
4.7.1. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	34
4.7.2. Atividade da enzima Catalase (CAT).....	35
4.7. 3. Glutaciona total e reduzida.....	35
4.8 Análise Estatística.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Avaliação dos parâmetros murinométricos e de consumo alimentar.....	37
5.2 Avaliação de Alterações Metabólicas séricas: Glicose, Insulina, Colesterol Total e Triglicerídeos.....	40
5.3 Avaliação do perfil lipídico no fígado.....	45
5.4 Avaliação do perfil antioxidante no fígado.....	48
5.5 Avaliação dos biomarcadores de dano mediado por oxidação no fígado.....	51
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, tem-se observado mudanças nos padrões alimentares e na qualidade nutricional das refeições (Papakonstantinou et al., 2022). Nesse sentido, sabe-se que o padrão alimentar ocidental é caracterizado pelo consumo excessivo de gorduras saturadas, açúcar, sal, álcool e outros elementos prejudiciais em detrimento do consumo de alimentos *in natura* e minimamente processados, como frutas, verduras, legumes, fibras e gorduras mono e poli-insaturadas. Uma meta-análise revelou que esse padrão alimentar ocidental pode aumentar em 56% o risco de acúmulo de lipídios no fígado, ou seja, esteatose hepática (Hassani; Mansoori; Hosseinzadeh, 2021).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), atualmente denominada doença hepática gordurosa metabólica (DHGM), é a principal causa de doença hepática crônica (Eslam, Sanyal, George, 2020). A sua prevalência mundial aumentou significativamente de 21,9% para 37,3% entre os anos de 1991 e 2019 (Le et al., 2022). A etiologia da DHGM tem sido amplamente discutida com o objetivo de enfatizar a disfunção metabólica como causa da doença (Jennison e Byrne, 2023). Segundo Pouwels et al. (2022), pacientes que possuem a DHGM apresentam, na maioria das vezes, um ou mais aspectos que caracterizam síndrome metabólica, como hipertensão sistêmica, dislipidemia, resistência à insulina ou diabetes.

É evidente que a composição da dieta desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da DHGM. Estudos, como o de Romero-Gómez et al. (2017), demonstraram que diferentes componentes da dieta têm um impacto significativo nesse processo e um dos principais focos de preocupação é a dieta hiperlipídica (DH) (García-Montero et al. 2021). Além disso, é importante ressaltar que o período de consumo de uma DH pode variar consideravelmente, podendo durar de alguns meses a anos, sendo que essa variação no tempo de consumo pode influenciar de maneira diferenciada a resposta metabólica (Buettner et al. 2007).

Dessa forma, no contexto da hiperalimentação, a ingestão de DH pode levar ao acúmulo de lipídios ectópicos, inclusive no fígado, causando a esteatose hepática, resultado de um desequilíbrio entre a produção e a degradação de lipídios, em razão da sobrecarga metabólica hepática (Nguyen et al., 2008). Sendo assim, esse acúmulo de lipídios hepáticos está associado a alterações na sinalização redox e mediadores metabólicos, fatores importantes no desenvolvimento e agravamento da DHGM (Jennison e Byrne, 2023).

Diante disso, a sobrecarga de lipídios no fígado resulta em uma produção excessiva de oxidantes, afetando diversos mecanismos que geram espécies reativas de oxigênio (EROs)

(Cuppari, 2019). Quando presentes em concentrações elevadas, essas EROs causam modificações oxidativas em macromoléculas celulares, como ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas, resultando no acúmulo de moléculas danificadas e lesões hepáticas (Peiseler et al., 2022). Ou seja, o estresse oxidativo está intimamente relacionado à patogênese da DHGM, sendo que os mecanismos que contribuem para a progressão da doença podem estar associados tanto ao dano oxidativo em biomoléculas quanto à sinalização redox desregulada (Clare et al., 2022). Torna-se claro então que, da mesma forma que o estresse oxidativo desempenha um papel significativo no desenvolvimento da DHGM, a persistência dos estímulos lipogênicos ao longo do tempo contribui para intensificar o estresse oxidativo. Esse processo cria um ciclo vicioso que agrava a doença, resultando no esgotamento das defesas antioxidantes e causando danos celulares, incluindo peroxidação lipídica das membranas e oxidação de proteínas (Świdarska et al., 2019).

Estudos têm relatado a modulação negativa das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) na DHGM (Ezhilarasan et al., 2022). A enzima SOD atua como catalisadora da dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Por conseguinte, a enzima CAT decompõe o H_2O_2 a O_2 e água (H_2O). Já a GPx atua em peróxidos em geral (Vasconcelos et al., 2007). A modulação negativa dessas enzimas reduz a ocorrência dessas reações, desencadeando um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua degradação, ou seja, indução do estresse oxidativo (Wolpe; Granzoti; Porsch, 2019).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da homeostase lipídica hepática e na sinalização redox na DHGM são complexos e estão interconectados (Paradies et al. 2014). Com base nessa premissa, a relevância deste estudo pré-clínico é compreender de forma mais clara como a duração da exposição, de curto e longo prazo, a uma dieta hiperlipídica rica em banha de porco pode afetar os mediadores metabólicos e marcadores de estresse oxidativo hepático em camundongos, e como essas alterações podem se intensificar ao longo do tempo, contribuindo para a progressão da DHGM. Diante do exposto, temos as seguintes hipóteses:

- H_0 (Hipótese nula): a duração da exposição (curto ou longo prazo) a uma dieta hiperlipídica rica em banha de porco não induz diferenças significativas nos mediadores metabólicos e perfil redox hepático em camundongos, nem influencia a progressão da DHGM.

- H_1 (Hipótese alternativa): a duração da exposição (curto e longo prazo) a uma dieta hiperlipídica rica em banha de porco afeta de forma distinta os mediadores metabólicos e perfil redox hepático em camundongos, sendo que a exposição prolongada agrava essas alterações e contribui para a progressão da DHGM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dietas ocidentais e sua relação com doenças crônicas não transmissíveis

A ocidentalização das dietas tem sido motivo de preocupação há muitos anos, preocupação essa que se intensificou à medida que seus efeitos adversos começaram a se manifestar sob a forma Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) (Adolph e Tilg, 2024). A dieta ocidental faz parte da transição nutricional, ou seja, aumento do consumo de alimentos processados e ultraprocessados, contribuindo para o aumento das DCNTs, enquanto a transição epidemiológica desencadeou uma redução das doenças transmissíveis (Moriguchi et al, 2022).

A industrialização, ocorrida entre os séculos XIX e XX, introduziu na alimentação humana um maior consumo de alimentos ricos em gordura saturada, açúcares, grãos refinados, sal, óleos vegetais e álcool, com alimentos como carnes vermelhas, farinhas refinadas e laticínios. Junto a isso, os alimentos ultraprocessados, criados para facilitar a alimentação dentro da rotina produtiva e corrida, são adicionados de açúcares, sal, gorduras e aditivos para ficarem mais hiperpalatáveis e serem armazenados por mais tempo. Em especial a gordura saturada é adicionada aos alimentos industrializados para conferir sabor, visto que solubiliza compostos aromáticos, e textura, como na emulsão (Infantes - Garcia et al, 2023). Entretanto, esses alimentos, que são intrínsecos a dieta ocidental, são hipercalóricos e contribuem para o aumento da obesidade (Adolph e Tilg, 2024).

Incorporado a esse cenário, está a redução significativa da ingestão de frutas, vegetais, grãos integrais e gorduras mono e poliinsaturadas, que são responsáveis por fornecer fibras, vitaminas e minerais, além de antioxidantes naturais (Malesza et al., 2021). Associada ao perfil da dieta ocidental, é importante ressaltar que houve também um aumento da quantidade consumida, visto que a alimentação é um ato social de comemoração e de recompensa às condições emocionais, aliada a hiperpalatabilidade, inatividade física e o estilo de vida sedentário, o que aumenta a sua contribuição para as DCNTs (Clemente-Suárez et al., 2023).

As características da dieta ocidental permitem que ela seja capaz de causar efeitos metabólicos como hiperinsulinemia, resistência à insulina, dislipidemias e estresse oxidativo, podendo desencadear, por consequência, uma inflamação sistêmica (Malesza et al., 2021). Isso porque, além de ser um perfil alimentar baixo em antioxidantes naturais, ela é capaz de reduzir a atividade de antioxidantes endógenos, como a glutatona (GSH) e a superóxido dismutase (SOD), por meio do elevado consumo de gorduras saturadas e açúcares simples, exacerbando o estresse oxidativo, levando ao desenvolvimento das DCNTs (Clemente-Suárez et al., 2023).

O indicador de obesidade segundo a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), demonstrou um aumento de adultos com obesidade de 11,8% em 2006 para 24,3% em 2023 (Vigitel, Brasil, 2023). Por conseguinte, a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) ressaltou que, em 2019, o público mais afetado pela obesidade eram as mulheres e a faixa etária que mais apresentou obesidade, independente do sexo, foi entre 45 a 59 anos, ou seja, a população adulta. Já ao analisar o excesso de peso na população, o VIGITEL de 2023 evidenciou que 61,4% da população adulta estava incluída nesta classificação. Ao analisar dados referentes à DCNTs, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que elas são responsáveis por matar 41 milhões de pessoas todos os anos, o que equivale a aproximadamente 74% de todas as mortes mundiais (Adolph e Tilg, 2024).

Apesar dos visíveis impactos dessa dieta à saúde pública, os governos ainda não possuem estratégias eficazes para controlar o aumento das DCNTs (Adolph e Tilg, 2024). No Brasil, há diversas políticas de alimentação e nutrição que tentam elaborar estratégias para enfrentar esse desafio, como o Plano Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional, a portaria N° 424/2013 e o Caderno de Atenção Básica N° 38, que elaboram estratégias e uma linha de cuidados para pessoas com DCNTs (Rauber e Jaime, 2019). Entretanto o ambiente, que ainda permanece obesogênico e a falta de informação populacional, não colabora para que a população consiga mudar seus hábitos de vida a longo prazo, sendo necessário um maior esforço governamental para reverter essa situação (Moriguchi et al., 2022).

2.2 Metabolismo de lipídios e a produção de espécies reativas de oxigênio

Os lipídios que fazem parte da dieta podem ser classificados de acordo com a sua composição bioquímica. Os ácidos graxos saturados (AGS), presentes em grande quantidade na dieta ocidental, são formados por ligações simples, sendo encontrados em alimentos de origem animal, como manteiga, banha de porco, carne vermelha, queijos e leite. Alguns exemplos desse tipo de lipídios são o mirístico (MA, 14:0), o palmítico (PA, 16:00) e o ácido esteárico (SA, 18:0) (Marcinkowska e Górnicka, 2023). As diretrizes de alimentação e nutrição recomendam que a ingestão dos AGS seja limitada a menos de 10% da ingestão diária de energia da população adulta (WHO, 2018).

Outro ácido graxo existente é o monoinsaturado (MUFA), ou seja, que possui apenas uma ligação dupla. Eles são derivados do azeite de oliva e das nozes, por exemplo, como o ácido oleico (OA, 18:1 n-9). Essa classe é conhecida por reduzir a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e mediadores inflamatórios, além de aumentar as citocinas anti inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10). Por fim, os ácidos graxos poliinsaturados

(PUFA) são aqueles que possuem duas ligações duplas ou mais. Em geral, são subdivididos em ácido linoléico (LA, 18:0 2n-6), ou também chamados de ômega 6 (n-6), e em ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3), chamados de ômega 3 (n-3). Ambos são essenciais e devem estar inseridos na alimentação, pois não podem ser produzidos por mamíferos. Eles são encontrados na linhaça, chia e óleos vegetais, sendo fundamentais para a produção do ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docosahexaenoico (DHA), ou podem ser encontrados nos peixes (Marcinkowska e Górnicka, 2023). O EPA e o DHA são PUFAs n-3 que contribuem na redução da inflamação (Troesch et al., 2020). A grande questão é que a dieta atual tem uma proporção de ômega 6/ômega 3 que pode chegar até 20:1, que é considerada prejudicial à saúde e contribui para desencadear consequências metabólicas (Malesza et al., 2021). O PUFA n-3, em especial, é o responsável por atuar na redução das prostaglandinas e citocinas inflamatórias, por esse motivo a sua ingestão não deve ser tão baixa em relação ao PUFA n-6 (Gutiérrez, Svahn e Johansson, 2019).

Quando o alimento é colocado na boca, a primeira etapa é um processamento mecânico dos lipídios e a ação da saliva que envolve o bolo alimentar para auxiliar na lubrificação. Atualmente, há uma discussão a respeito da presença da lipase lingual em humanos, já confirmada em ratos e camundongos, que auxiliaria o processo de digestão dos lipídios ainda na cavidade oral (Salhi et al., 2021). O bolo alimentar segue pelo trato gastrointestinal até chegar no estômago, onde é inundado pelo suco gástrico e os lipídios são emulsionados. Nesse momento, ocorre também a adsorção da lipase gástrica na interface das gotículas lipídicas para iniciar a hidrólise dessas moléculas, sendo responsável por cerca de 10 a 30% da hidrólise em adultos. Quando chegam no intestino delgado, as partículas sofrem ação da lipase pancreática humana, com a ajuda dos ácidos biliares. Os ácidos graxos de cadeia curta são absorvidos pelos enterócitos na veia porta, mas os de cadeia longa precisam também ser reesterificados em triacilgliceróis (TAG), incorporados aos quilomícrons, para enfim entrar nas vias linfáticas e serem direcionados para o fígado. Essa absorção é maior no jejuno. Quando há um excesso de ácidos graxos no fígado, aumenta-se a produção das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que se tornam, posteriormente, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que podem ser detectadas no sangue (Acevedo - fani, 2022). A dieta ocidental é caracterizada por ser composta por alimentos que aumentam as LDL e o colesterol total (Adolph e Tilg, 2024).

O metabolismo lipídico hepático é caracterizado, portanto, por uma captação e exportação de ácidos graxos, lipogênese e utilização destes ácidos graxos na β -oxidação. Quando existe um desequilíbrio entre essas vias, o acúmulo de lipídios no fígado se inicia e, a longo prazo, há a ativação de vias inflamatórias e fibróticas (Badmus et al., 2022). Estudos

experimentais com camundongos têm demonstrado que uma dieta rica em colesterol é capaz de promover oxidação de fosfolípidios e, conseqüentemente, esteatose hepática (Adolph e Tilg, 2024).

Por meio da β -oxidação, os ácidos graxos são transformados em acetil-CoA, que participam do ciclo do ácido cítrico (CAC). Quando chegam no fígado, durante a lipogênese de novo, a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) converte acetil-CoA em malonil-CoA, que, em seguida, é convertido em palmitato pela ácido graxo sintase (FAS). Já a estearoil-CoA dessaturase-1 (SCD1) é responsável por catalisar a formação de oleato e palmitoleato a partir de estearoil-CoA e palmitoil-CoA. Esses ácidos graxos sofrem uma ampla variedade de modificações, como dessaturações, alongamento e esterificação, antes que sejam armazenados como triglicerídeos ou de serem exportados como VLDLs (Badmus et al., 2022).

A oxidação dos ácidos graxos ocorre principalmente nas mitocôndrias, no entanto, quando se trata de ácidos graxos de cadeia muito longa, essa oxidação se inicia nos peroxissomos. Quando existe uma sobrecarga lipídica, como no caso da obesidade, as enzimas do citocromo P450 auxiliam nesse processo, entretanto, a oxidação por essa via produz grandes quantidades de EROS, promovendo inflamação (Acevedo - fani, 2022).

A exportação dos triglicerídeos é um importante mecanismo de regulação dos lipídios hepáticos. Para isso é necessário a presença da apolipoproteína B100 (apoB100) e da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomais (MTTP). O VLDL é formado no retículo endoplasmático (RE), sendo transferido, em seguida, ao complexo de Golgi para amadurecerem e serem levados a corrente sanguínea pela apoB100. Quando há uma exposição moderada à ácidos graxos, ocorre um aumento na secreção da apoB100. Entretanto, níveis muito elevados causam estresse no RE, que inibe a secreção dessa proteína, o que leva à esteatose hepática pela redução na excreção do VLDL (Badmus et al., 2022).

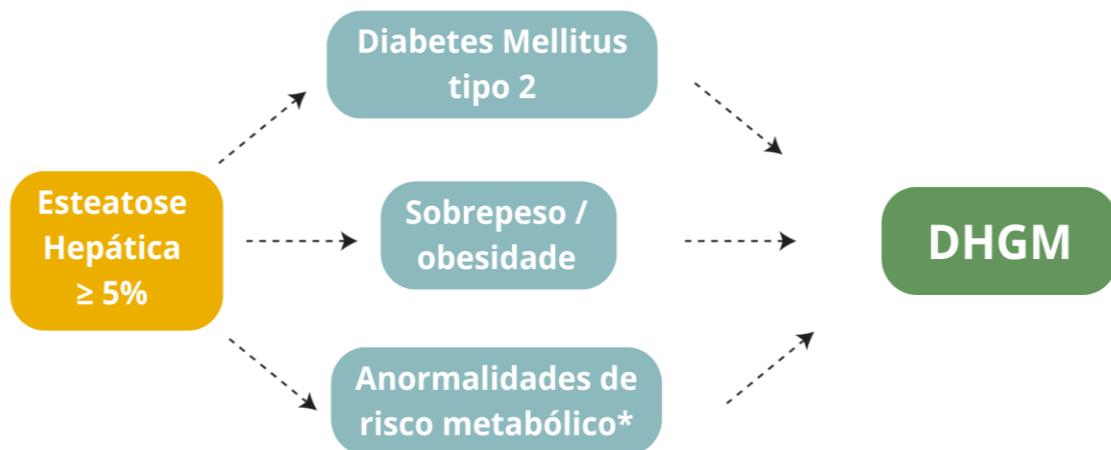
2.3 Doença Hepática Gordurosa Metabólica (DHGM) associada ao consumo elevado de lipídios na dieta

A DHGM trata-se de uma condição em que ocorre um acúmulo de gordura no fígado aliada à disfunção metabólica (Badmus et al., 2022). Comumente, essa doença está associada a síndrome metabólica, obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemias, ou seja, DCNTs (Arab, Arrese e Trauner, 2018). Atualmente, o método padrão ouro para determinar o diagnóstico dessa doença é a biópsia hepática, além de possibilitar a distinção entre a DHGM e a esteato - hepatite não alcoólica (EHNA). Por ser um método invasivo, exames bioquímicos e de imagens são usados juntos para auxiliar no estabelecimento do

diagnóstico. (Chen et al., 2020). Em 2019, essa doença estava afetando cerca de 37,3% da população mundial, sendo a América do Sul a responsável pela maior prevalência global de 44% (Fouad, Alborai e Shiha, 2024).

Na obesidade, quando o tecido adiposo não consegue mais armazenar toda a gordura que chega até ele, há a necessidade de um armazenamento ectópico em outros tecidos como coração, rins e fígado. A esteatose hepática é caracterizada por esse acúmulo de gordura no fígado e pode ser classificada em vários graus, sendo zero aquele fígado que apresenta menos de 5% de gordura, grau 1 quando varia de 5 a 33%, grau 2 quando o acúmulo é entre 34 a 66% e, por fim, o grau 3 é considerado um acúmulo grave de mais de 66% (Badmus et al., 2022). A DHGM é caracterizada por pelo menos 5% ou mais do peso do fígado de acúmulo de gordura e ainda a presença de fatores desreguladores metabólicos, como diabetes mellitus tipo 2, excesso de peso ou obesidade e anormalidades de risco metabólico (Figura 1) (Gofton et al., 2023).

Figura 1 - Critérios diagnósticos da DHGM



Fonte: Adaptado de Gofton et al., 2023.

*Anormalidades de risco metabólico - 2 em 7:

1. Circunferência da cintura >102/88 em homens e mulheres caucasianos, >90/80 cm;
2. Pressão arterial 130/85 mmHg ou tratamento medicamentoso específico;
3. Triglicerídeos plasmáticos >150 mg/dL (>1,70 mmol/l) ou tratamento medicamentoso específico;
4. Colesterol HDL plasmático <40 mg/dL (<1,0 mmol/L) para homens e <50 mg/dL (<1,3 mmol/L) para mulheres ou tratamento medicamentoso específico;
5. Pré-diabetes (ou seja, níveis de glicemia de jejum 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L ou níveis de glicemia pós-carga de 2 horas 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L ou HbA1c de 5,7-6,4% (39-47 mmol/mol));
6. Avaliação do modelo Homeostash de pontuação de resistência à insulina > 25;
7. Nível de proteína C reativa de alta sensibilidade plasmática 2 mg/L.

A patogenicidade da DHGM é multifatorial, abrangendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. O acúmulo de gordura no tecido hepático, faz com que o fígado induza uma inflamação e morte celular, o que promove a superprodução de oxidantes, ou seja, o estresse oxidativo e, posteriormente, a fibrose. A lesão hepática ocorre em razão das modificações em macromoléculas causadas pelas altas concentrações de EROS. Outro mecanismo pelo qual o estresse oxidativo promove o desenvolvimento da DHGM é a sinalização redox desregulada, gerando respostas mal adaptadas, que promovem disfunção metabólica e resposta inflamatória (Chen et al., 2020).

Para que haja acúmulo de gorduras no fígado é necessário que, inicialmente, ocorra um desequilíbrio no metabolismo de lipídios, ou seja, entre a produção e a degradação. Mais da metade dos lipídios que vão participar da patogênese da doença são derivados da lipólise periférica ou do pool de ácidos graxos não esterificados (Arab, Arrese e Trauner, 2018). A baixa sensibilidade à insulina é uma das principais características da DHGM, fazendo com que haja mais lipólise nos adipócitos, aumentando a entrega de ácidos graxos ao fígado. A segunda principal fonte é proveniente da lipogênese de novo, onde os hepatócitos convertem o excesso de glicose e frutose da dieta em ácidos graxos. Em seguida, a resistência à insulina no músculo esquelético gera hiperglicemia e hiperinsulinemia, que induz a ativação de uma via que aumenta a lipogênese a partir de glicose no fígado. Por fim, a última fonte vem dos lipídios da dieta (Samuel e Shulman, 2018).

Os dois destinos possíveis para os lipídios hepáticos é a β -oxidação nas mitocôndrias, nos peroxissomos ou nos microsossomos para produção de energia pela participação no CAC, ao serem transformados em acetil-CoA, principalmente no jejum, e a esterificação para formar TAGs, a partir daí o fígado tenta aumentar a exportação de VLDL, desencadeando hipertrigliceridemia. Um ponto importante é que o fígado atinge um platô na produção de VLDL, não conseguindo exportar essas moléculas, fazendo com que mais gordura permaneça acumulada (Chen et al., 2020).

O sistema imunológico inato também é importante no desenvolvimento da DHGM. Isso porque os produtos resultantes de bactérias são identificados pelo sistema imunológico através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo o mais estudado o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias gram-negativas.

Nesse sentido, uma vez que os PAMPs chegam no fígado, eles são capazes de ativar as células imunes por meio dos receptores de reconhecimento de padrões, como os Toll-like ligados à membranas (TLRs) e os de domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos citoplasmáticos (NLRs) e desencadearem uma resposta inflamatória. O desequilíbrio intestinal

causado por uma dieta rica em gorduras leva à liberação de LPS e de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), provenientes de células e tecidos lesionados. Esses elementos ativam os receptores do tipo TLRs, desencadeando processos inflamatórios e estresse oxidativo que contribuem para a piora da patogênese da DHGM (Arab, Arrese e Trauner, 2018).

Embora o desenvolvimento da DHGM induza ao estresse oxidativo, esse mesmo estresse também contribui para a progressão da doença. Isso ocorre porque as EROS promovem a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em disfunções metabólicas, dano celular e intensificação dos processos de inflamação e fibrose. Com isso, estabelece-se um ciclo vicioso que agrava continuamente o quadro da DHGM (Robea et al., 2023).

Com o acúmulo de lipídios no fígado, a ocorrência de inflamação e estresse oxidativo, seguido de danos e lesões em células e tecidos desse órgão, é necessário um mecanismo de cicatrização. A fibrogênese hepática é caracterizada como a deposição excessiva de proteínas de matriz extracelular de alta densidade, que, em último caso, pode levar a cirrose hepática (Arab, Arrese e Trauner, 2018).

2.4 Estresse Oxidativo induzido pela dieta hiperlipídica e biomarcadores de dano mediado pela oxidação

Um dos mecanismos pelos quais a dieta ocidental tem sido responsável por causar as DCNT é por meio do estresse oxidativo, que é definido como o desequilíbrio entre a produção de EROS e o sistema antioxidante (Clemente-Suárez et al., 2023).

Algumas das organelas responsáveis por realizarem a produção das EROS são as mitocôndrias, peroxissomos e o RE em seus processos fisiológicos. Na maioria das células, as mitocôndrias são as responsáveis por produzirem em maior quantidade, principalmente durante o metabolismo energético (Chen et al., 2020).

As EROS podem ser divididas em radicais livres, como $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila (HO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}), dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}), ânion radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) e alcoxil/alquil peroxila ($RO^{\bullet}/ROO^{\bullet}$), e em não radicais, que incluem o H_2O_2 , ácido hipocloroso ($HOCl$) e peroxinitrito ($ONOO^-$)/ ácido peroxinitroso ($ONOOH$). Elas podem ser produzidas em reações sequenciais enzimáticas ou não, onde um radical pode ser convertido em outro. Para garantir uma estabilidade das EROS, há vias fisiológicas de depuração, como a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 pela enzima SOD. Posteriormente, o H_2O_2 é decomposto em H_2O e O_2 pela enzima catalase (CAT). Além dessa via, há também a decomposição de H_2O_2 e

hidroperóxido lipídicos (LOOH) pela glutathiona peroxidase (GPX), ao utilizar a glutathiona (GSH) como doadora de elétrons (Zhang et al., 2019).

Em níveis normais, essas moléculas de EROS são responsáveis por realizar a sinalização no metabolismo celular, sobrevivência, defesa imunológica, proliferação e diferenciação celular através da modulação dos fatores de transcrição e vias epigenéticas. Em excesso há uma sinalização patológica, causando danos celulares (Chen et al., 2020).

O acúmulo de lipídios no hepatócito também induz um estresse no RE, aumentando a produção de EROS, responsáveis por ativar vias fibróticas (Badmus et al., 2022). Além disso, a esteatose hepática pode ser desenvolvida quando não há resolução do estresse do RE, fazendo com que haja regulação positiva das vias de entrada de lipídios e regulação negativa das vias de saída. Outro fator que contribui para isso é o estresse dessa organela, que promove a ativação do fator de transcrição adipogênico, chamado de proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP-1c), estimulando a adipogênese (Guo et al., 2022).

Em nível intestinal, os produtos da oxidação de ácidos graxos são responsáveis pela oxidação intracelular e peroxidação de fosfolipídios de membrana, aumentando a permeabilidade intestinal (Malesza et al., 2021). As enzimas do citocromo P450, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases, o grupamento heme e íons metálicos como ferro e cobre também são responsáveis por produzirem EROS e contribuir para o estresse oxidativo (Robea et al., 2023). Pacientes com DHGM apresentam danos mitocondriais e, consequentemente, atividade reduzida do complexo da cadeia respiratória, levando a síntese prejudicada de adenosina trifosfato (ATP). Ademais, as EROS oxidam depósitos de gordura liberando peróxidos lipídicos, que nos hepatócitos vão prejudicar a cadeia respiratória, o que leva a produção de mais EROS, contribuindo para o ciclo vicioso (Guo et al., 2022).

Nem todos os lipídios são lipotóxicos, como por exemplo os MUFAs e os PUFAs que demonstram ter efeitos protetores (Guo et al., 2022). Entretanto, a dieta rica em gordura saturada está correlacionada com a ativação do receptor Toll like 4 (TLR4), que detectam patógenos invasores ou sinais de danos endógenos, e expressão gênica de citocinas pró inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), em macrófagos colônicos e hepáticos (Malesza et al., 2021). Alguns estudos têm demonstrado que a expressão de TLR4, principalmente em macrófagos, é aumentada nos pacientes com gordura no fígado (Parthasarathy, Revelo e Malhi, 2020).

Os danos lipotóxicos em geral liberam citocinas e quimiocinas que conseguem ativar as células imunes inatas e adaptativas, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos e neutrófilos, desencadeando uma cascata de inflamação (Lee, Wu e Lin, 2022). Quando há o

desenvolvimento da DHGM, a expressão dos componentes do inflamassoma da proteína 3 do receptor semelhante a Nod (NLRP3) é aumentada em comparação ao hepatócito saudável. Ele pode ser ativado por PAMPs e também DAMPs, sendo o LPS um dos principais gatilhos para essa ativação, aumentando a inflamação do fígado (Parthasarathy, Revelo e Malhi, 2020).

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é o dano mediado por oxidação em macromoléculas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, em razão da sua maior reatividade com os constituintes moleculares das células, o que gera uma lesão celular e interrupção da homeostase (Demirci - çekiç et al., 2022). A avaliação do dano mediado por oxidação é fundamental para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados a diversas doenças metabólicas. Dentre os métodos mais utilizados para mensurar esse tipo de dano, destacam-se o ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) para a peroxidação lipídica e o método do DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) para quantificação de proteínas carboniladas (Clemente-Suárez et al., 2023). Além disso, pode-se avaliar os antioxidantes enzimáticos endógenos, como as enzimas SOD, CAT e GPX, ou os não enzimáticos, como GSH, alfa tocoferol e ubiquitina. Normalmente, suas concentrações apresentam-se diminuídas nos pacientes com DHGM, mas pode-se encontrar elevadas em algumas exceções (Chen et al., 2020).

O método de TBARS baseia-se na detecção de produtos secundários da peroxidação lipídica, principalmente o malondialdeído (MDA). Em condições de estresse oxidativo, os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares sofrem peroxidação, gerando o MDA como um dos principais subprodutos. Apesar de sua ampla aplicação devido à simplicidade e baixo custo, o método TBARS possui limitações quanto à especificidade, uma vez que o TBA pode reagir com outros aldeídos e compostos oxidativos, podendo superestimar os níveis de MDA (Poloczek et al., 2022).

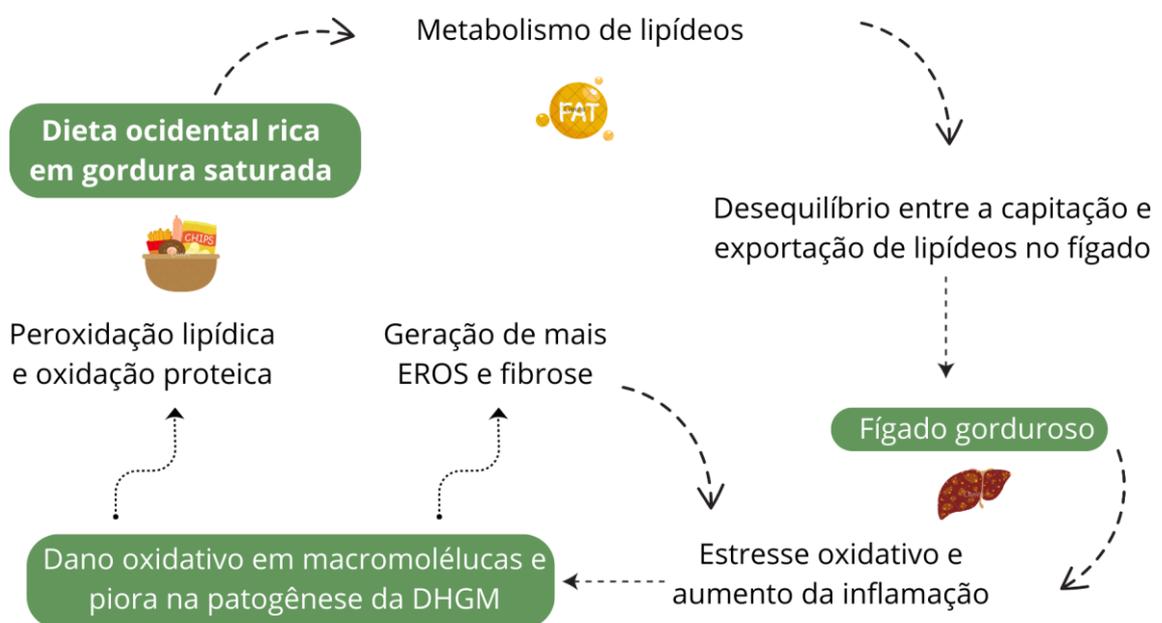
Os produtos de peroxidação lipídica podem danificar as membranas mitocondriais, prejudicando o funcionamento adequado da cadeia transportadora de elétrons. Aliado a isso, a cardiolipina, um dos principais fosfolipídios que compõem a membrana interna da mitocôndria, é muito suscetível a danos oxidativos, alterando a fluidez da membrana, induzindo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). Alguns produtos dessa peroxidação são os isoprostanos (IsoPS), resultantes da fosforilação dos ácidos graxos de membrana, os neuroprostanos (NPs), que derivam da peroxidação do DHA MDA, formados a partir da peroxidação de PUFAs (Chen et al., 2020).

A oxidação de proteínas é outro marcador relevante do estresse oxidativo e pode ser avaliada pela quantificação de grupos carbonila introduzidos nas cadeias laterais de

aminoácidos como prolina, arginina, lisina e treonina. O método mais utilizado para essa finalidade é a reação com DNPH, que forma hidrazonas estáveis com os grupos carbonila. A dosagem de carbonilas proteicas por DNPH é considerada um marcador confiável e relativamente específico do dano oxidativo a proteínas, sendo amplamente utilizada em estudos experimentais e clínicos (Miralles-Pérez et al., 2021).

Além de causar alterações importantes em suas propriedades, como na estrutura e na solubilidade, essas modificações irreversíveis promovem a inativação enzimática, comprometendo diversos mecanismos bioquímicos dependentes dessas enzimas. Por fim, as proteínas do DNA podem sofrer ligações cruzadas por causa das EROS, além da modificação de bases e formação de açúcares (Demirci - çekiç et al., 2022). Os efeitos do consumo de dietas ricas em gorduras sobre o perfil redox hepático e a progressão da doença hepática gordurosa metabólica estão resumidos na Figura 2. Diante do exposto, essa pesquisa representa um avanço significativo na compreensão das alterações metabólicas e do perfil redox induzidas por uma dieta rica em banha de porco, contribuindo para o entendimento de como essas modificações podem evoluir ao longo do tempo. Esses achados reforçam a importância de investigar estratégias de prevenção e intervenção que minimizem os impactos negativos de padrões alimentares na saúde hepática.

Figura 2 - Efeitos da Dieta Hiperlipídica no Desequilíbrio Redox e na Progressão da Doença Hepática Gordurosa Metabólica (DHGM)



Fonte: Autoria própria, 2025.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil metabólico e os biomarcadores do perfil redox hepático na progressão da DHGM em camundongos C57Bl/6 submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica durante oito e dezesseis semanas.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil murinométrico;
- Avaliar a ingestão alimentar;
- Avaliar o perfil glicometabólico e lipídico séricos;
- Avaliar o perfil lipídico hepático;
- Avaliar o perfil antioxidante hepático;
- Avaliar os marcadores de dano oxidativo hepático.

4 METODOLOGIA

4.1 Cuidados éticos

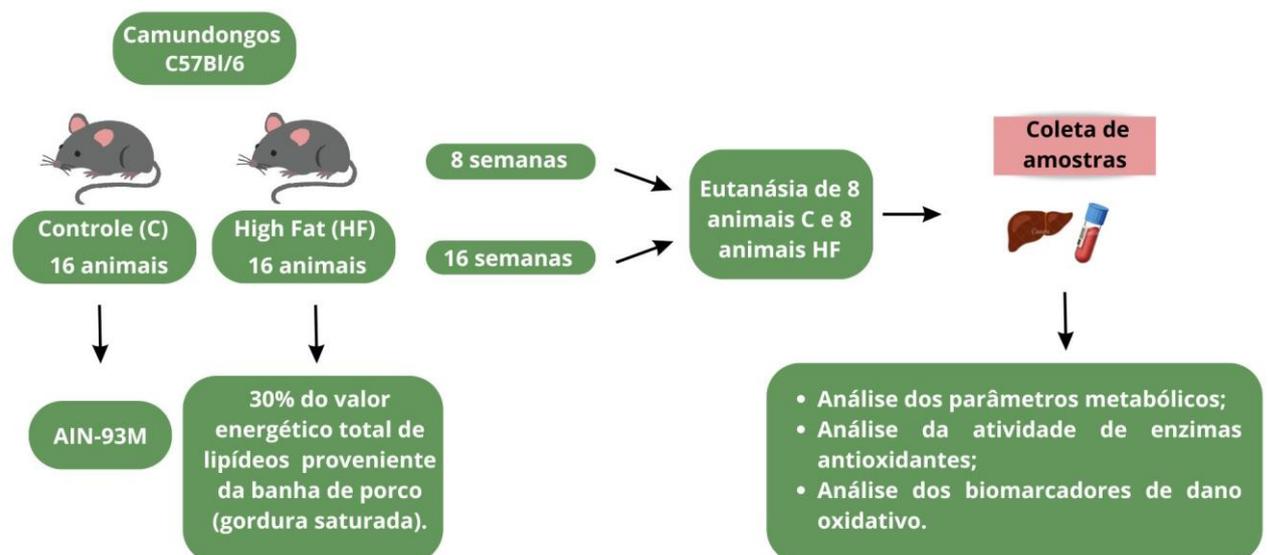
O projeto proposto neste estudo é parte integrante de uma proposta maior intitulada “Avaliação dos déficits neurocognitivos, dano oxidativo e alterações na microbiota intestinal induzidos por dietas obesogênicas”, aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP), sob o número de protocolo 9100220322.

4.2 Animais e delineamento experimental

Para o delineamento experimental proposto neste estudo foram utilizados 32 camundongos C57Bl/6 machos e recém desmamados. O tamanho da amostra foi calculado por meio do software G*Power® versão 3.1.9.2, com poder de 0,90 e nível de significância de 5%.

Os animais foram mantidos em ambiente com condições de temperatura, luz e umidade controladas, acondicionados em caixas de polipropileno, com 3 animais por caixa, e receberam ração e água *ad libitum*. Foram formados dois grupos com 16 animais cada, em que estes foram distribuídos randomicamente, a saber: Grupo Controle (C), que recebeu dieta padrão AIN-93M e Grupo Dieta Hiperlipídica (DH), que recebeu dieta com 30% do valor energético total proveniente de fonte lipídica proveniente de banha de porco.

Figura 3 - Fluxograma do delineamento experimental



Fonte: Autoria própria, 2025.

As dietas foram oferecidas logo após o desmame dos animais. A dieta hiperlipídica foi confeccionada no laboratório de Nutrição Experimental (LabNex) da Escola de Nutrição e já havia sido padronizada em estudos anteriores do grupo de pesquisa, mostrando-se eficaz para induzir DHGM (Dias, B. et al., 2022; Gomes, S et al., 2023). As dietas foram confeccionadas na forma de pellets e armazenadas protegidas da luz, em temperatura de refrigeração (0 a 4 °C), apresentando variação energética total entre as dietas menor do que 15% do valor energético total. Todas as dietas apresentaram o percentual de 18 a 20% de proteínas, além das vitaminas e minerais fundamentais para o adequado desenvolvimento dos camundongos (Reeves; Nielsen e Fahey, 1993).

A ingestão hídrica e alimentar foi acompanhada 2 vezes por semana. Após 8 semanas ou 16 semanas, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg), xilazina (20 mg/kg) e acepromazina (3 mg/kg) e, posteriormente, eutanasiados por exsanguinação. Soro e fígado foram coletados e armazenados a -80oC para serem usados para as dosagens dos mediadores metabólicos e biomarcadores de perfil redox.

Quadro 1 - Caracterização das dietas

Grupo	Dieta	Valor calórico (Kcal/100g)
Controle (C)	AIN - 93M 4,1% do valor energético total de lipídios (proveniente de óleo de soja). 67,5% do valor energético total de carboidratos (proveniente do amido de milho)	379,4 kcal
High Fat (HF)	30% do valor energético total de lipídios (proveniente da banha de porco-gordura saturada) 45% do valor energético total de carboidratos (proveniente do amido de milho)	439,4 kcal

Legenda: Caracterização das dietas ofertadas aos camundongos submetidos ao consumo de dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas. Fonte: elaboração própria, 2025.

4.3 Dados murinométricos e parâmetros de consumo alimentar

4.3.1 Ganho de Peso Total, Índice de Adiposidade, Coeficiente de eficiência alimentar (CEA), Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico (CGPCC)

Os animais eram trocados de caixa duas vezes por semana, nesse momento ocorria também a reposição das rações e da água e avaliação da ingestão alimentar. Os animais eram pesados uma vez por semana.

A avaliação do consumo era realizada a partir da pesagem da ração colocada, descontando-se a ração não ingerida desde a última troca, dividindo pelo número de animais nas gaiolas (n=3). Para avaliação dos efeitos do consumo alimentar foram utilizadas as medidas de consumo e o peso dos animais, sendo calculado a partir desses dados os seguintes parâmetros: *Ganho de peso (g)*: $(Peso\ inicial - Peso\ final)$, aumento de tecido adiposo pelo *Índice de Adiposidade (%)*: $[(gordura\ total/peso\ corporal\ final) \times 100]$, eficiência do ganho de peso pelo *CEA*: $[(Peso\ final\ (g) - Peso\ inicial\ (g)) / Quantidade\ total\ de\ ração\ ingerida\ no\ período\ experimental\ (g)]$ e, por fim, a relação entre o ganho de peso pelo teor energético da dieta, chamado de *CGPCC* = $ganho\ de\ peso\ (g) / quantidade\ alimentar\ calórica\ ingerida\ (Kcal)$.

4.4 Dosagens Bioquímicas séricas

4.4.1 Glicose, Triglicérides e Colesterol Total

Para determinação das dosagens bioquímicas séricas, as amostras de soro coletadas na eutanásia em 8 e 16 semanas foram submetidas a análise realizadas por meio dos kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil), conforme as instruções disponibilizadas pelo fabricante.

- **Glicose:** a enzima glicose oxidase é responsável por catalisar a oxidação da Glicose a Ácido Glucônico e Peróxido de Hidrogênio. Esse Peróxido de Hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento. Dessa reação foi formada uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. Para essa reação, foram usados 3 tubos de ensaio, sendo um para o branco, um teste e um padrão. No primeiro, foram adicionados apenas 1 ml do reagente 1. No tubo teste, 0,01 ml de amostra e 1 ml do reagente 1. Por fim, no padrão, foram adicionados 0,01 ml do reagente padrão (nº2) e 1 ml do reagente 1. Após agitação, os tubos foram colocados em banho maria, sendo aquecidos a 37°C, por 15 minutos. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Bioespectro) de 505 nm. A cor se mantém estável por 60 minutos. Para o cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

Glicose (mg/dL) = Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

- **Triglicerídeos:** Os triacilgliceróis são determinados por meio de 4 reações responsáveis por formar um sistema enzimático. Nesse sistema, ocorre a quebra dos triglicerídeos liberando glicerol, que, por sua vez, é convertido em glicerol-3 fosfato. Em sequência, o glicerol-3 fosfato é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, em que o peróxido de hidrogênio reage com a 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, produzindo quinoneimina de cor vermelha. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra e sua absorvância pode ser quantificada através do uso do espectrofotômetro. Para isso, 3 tubos foram utilizados. No tubo 1, referente ao branco, foram adicionados apenas 1 ml do reagente 1. No tubo de teste, 0,01 ml de amostra e 1 ml do reagente 1. Por último, no tubo 3, considerado padrão, foram adicionados 0,01 ml do reagente padrão (n°2) e 1 ml do reagente 1. Após as amostras serem misturadas, os tubos foram aquecidos em banho maria a 37°C, por 10 minutos. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Bioespectro) de 505 nm. A cor se mantém estável por 60 minutos. Para o cálculo, foi utilizada a seguinte fórmula:

Triacilgliceróis (mg/dL) = Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113

- **Colesterol total:** para determinação do colesterol total, uma série de reações ocorrem, formando um sistema enzimático. Sendo assim, os ésteres de colesterol são hidrolisados em ácidos graxos e colesterol. O colesterol considerado livre é oxidado formando colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Por fim, o peróxido de hidrogênio reage com o Fenol e a 4-Aminoantipirina, tendo como resultado dessa oxidação a antipirilquinonimina e água. A antipirilquinonimina é a responsável pela coloração avermelhada, na qual a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra, possibilitando a quantificação através do espectrofotômetro. Para a realização dessas reações, 3 tubos foram utilizados. No tubo do branco, foram adicionados apenas 1 ml do reagente 1. No tubo referente ao teste adicionou-se 0,01 ml de amostra e 1 ml do reagente 1 e no tubo 3, padrão, foram adicionados 0,01 ml do reagente padrão (n°2) e 1 ml do reagente 1. Em sequência, as amostras foram agitadas e os tubos aquecidos em banho maria a 37°C, por 10 minutos. Para determinação das absorvâncias foi utilizado um espectrofotômetro (Bioespectro) de 500 nm. A cor se mantém estável por 60 minutos. Para o cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

Colesterol mg/dL = Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

4.4.2. Insulina

Para determinação da insulina foi utilizado um teste imunoenzimático do tipo ELISA, por meio do kit comercial LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Diante disso, uma placa foi lavada com uma solução de Wash Buffer e, em seguida, foram adicionados 10 µL de Assay buffer nos poços referentes ao branco e às amostras. Por conseguinte, para determinação das curvas foram adicionados 10µL de cada padrão. Nos poços de controle, foram pipetados 10µL de QC1 e 10µL de QC2. Por fim, nos demais poços foram colocadas 10 µL da amostra. Após esse processo, foi adicionado em todos os poços 80µL do anticorpo de detecção. A placa foi coberta com selador e incubada por 2 horas em temperatura ambiente em um agitador de placas, na velocidade moderada, entre 400 e 500 rpm. Depois da incubação, as soluções foram descartadas e cada poço da placa foi lavado três vezes, para só então serem adicionados 100µL da solução enzimática. Com isso, a placa foi coberta, selada e novamente incubada em um agitador de velocidade moderada, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Novamente as soluções foram descartadas e os poços lavados seis vezes com 300 µL de Wash buffer e, em seguida, foram adicionados 100µL de substrate solution em todos os poços. A placa foi selada e incubada de 5 a 20 minutos, como já descrito anteriormente. Após o tempo de incubação, o selador foi retirado e foram adicionados 100 µL da solução Stop, movimentando a placa com a finalidade de misturar as soluções. Para realizar a leitura, foi utilizada uma absorvância de 450 nm e 590 nm no espectrofotômetro (Bioespectro).

- **Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR):** para avaliação da resistência à insulina foi utilizado o índice HOMA-IR, calculado a partir dos valores de glicose e insulina, que foram encontrados pela análise bioquímica sérica, pela seguinte fórmula:

$$HOMA-IR = [(insulina \text{ em jejum (mmol/L)} \times glicose \text{ em jejum } (\mu U/ml)) / 22,5] \text{ ou}$$

$$HOMA-IR = [glicose \text{ em jejum (mg/dl)} \times insulina \text{ em jejum } (\mu U/ml) / 405]$$

4.5 Perfil lipídico hepático

4.5.1. Extração e quantificação de lipídios no fígado

Para determinação do percentual de lipídios hepáticos foi realizada a sua extração a partir do método de FOLCH (FOLCH et al., 1957) que consiste na extração física da gordura presente no tecido hepático. Inicialmente, 100 mg de tecido hepático, em média, foram

macerados com 2000 µL de solução de Clorofórmio metanol (2:1) (LS chemicals) com o auxílio de um pistilo e gral de porcelana (Chiarotti, São Paulo, Brasil). A amostra macerada foi transferida para um primeiro tubo de ensaio e adicionado 400 µL de metanol (Neon, São Paulo, Brasil). Em seguida, para melhor homogeneização, a amostra foi levada ao vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) por 3 minutos e centrifugada (Centribio) a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi transferido para um tubo limpo com éter de petróleo (Ls chemicals) e pesado previamente. Nesse tubo, foram adicionados 800 µL de clorofórmio (LS chemicals) e 640 µL de uma solução de NaCl 0,73% (Dinâmica Química Contemporânea LTda) com pressão para homogeneizar. Mais uma vez a amostra passou pelo vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) por 1 minuto e pela centrífuga (Centribio) a 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a parede do tubo lavada com 1 ml da solução de FOLCH (composta de 14,69 de metanol, 0,98 ml de clorofórmio e 4,38 ml de água). O tubo foi agitado delicadamente e o sobrenadante descartado. Em uma estufa (CienlaB) semi-aberta a 80°C, o solvente foi evaporado durante 2 a 5 horas, observando a cada 1 hora até o aparecimento de uma marca amarelada no fundo do tubo. Após completa evaporação, o tubo foi levado ao dessecador para esfriar e, assim, realizada a pesagem.

Para a realização dos cálculos, foi considerada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ lipídios} = (\text{Peso final do tubo} - \text{peso inicial do tubo}) / \text{massa da amostra} \times 100$$

4.5.2. Colesterol Total e Triacilgliceróis Hepáticos

Após a determinação de lipídios do tecido hepático pelo método de Folch, a gordura que estava no tubo foi ressuspenida usando 1 ml de álcool isopropílico e, em seguida, os tubos foram agitados no Vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) por 30 segundos ou até dissolver toda a gordura. Após essa etapa, foram realizadas as dosagens de triglicérides e colesterol total utilizando o kit Liquiform (Ref 87 e 13, Labtest Diagnóstica S.A, Minas Gerais, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, foi utilizado um leitor de absorvância (Biospectro), em microplacas no comprimento de ondas 505 (490 a 520) para triglicérides e 500 (490 a 510) para colesterol total. As fórmulas utilizadas para obtenção dos resultados foram:

$$\text{Triacilglicerol ou Colesterol Total} = (\text{Absorvância da amostra} - \text{média do branco} / \text{Média da absorvância padrão}) \times 200$$

4.6 Biomarcadores de dano oxidativo no fígado

4.6.1. Proteína Carbonilada

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína pelas espécies reativas de oxigênio. Os derivados carbonílicos podem ser mensurados através de métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Neste método, o DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada por espectrofotômetro (Levine et al. 1994). Para realização da dosagem, foi utilizada uma amostra de 100 mg de tecido hepático que foi homogeneizada em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida o homogenato foi centrifugado (Centribio) a 10000g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado no procedimento experimental. O ensaio foi executado utilizando espectrofotômetro UV (Biospectro) no comprimento de onda de 370 nm. Para realização do experimento, 250 µL do homogenato foram pipetados em microtubos pretos, adicionando em seguida 250 µL dos reagentes TCA 10%. O microtubo foi agitado no vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil), sendo levado em seguida para a centrífuga a 5000 rpm a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), homogeneizando bastante com a pipeta. Os microtubos passaram novamente pelo vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) e foram incubados à temperatura ambiente e protegidos da luz por 1 hora. Durante esse tempo, os microtubos foram levados ao vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 250 µL de TCA 10% e novamente os microtubos foram levados ao vórtex e centrifugados a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionados 500 µL de etanol/acetato de etila (1: 1 v/v), para lavar o precipitado. Depois desse processo, os microtubos foram levados ao vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) e centrifugados (Centribio) por 10 minutos, a 5000 rpm, a 4°. Essa etapa de lavagem com o etanol/ acetato de etila foi realizada duas vezes, descartando o sobrenadante após a centrifugação. Por fim, foi adicionado 500 µL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 6% para dissolver o precipitado, levando novamente no vórtex e na centrífuga a 13000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. A leitura foi realizada com o sobrenadante no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mL, sendo obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Proteína carbonilada (PC -nmol/mL)} = \left(\frac{\text{Absorbância}}{22000 \text{ M.L-1.cm-1}(\epsilon)} \right) \times \left(\frac{1000000}{\text{Volume da Amostra}} \right)$$

4.6.2. Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Ácido tiobarbitúrico (TBA) é capaz de se ligar a lipídios oxidados, permitindo a quantificação de TBARS por método espectrofotométrico (DRAPER; SQUIRES; MAHMOODI; WU et al., 1993). Inicialmente, 100 mg do fígado foram homogeneizados em 1 mL de tampão Tris-HCl (20 mM) e o homogenato foi centrifugado (Centribio) a $10.000 \times g$ por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, 0,15 mL do sobrenadante foram misturados com 75 µL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCl 0,25 N), 0,75 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% de ácido acético 0,25 N) e 37,5 µL de butilhidroxitolueno (BHT) (125 mM em etanol). Os microtubos foram agitados no vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil) e incubados no termobloco a 95°C por 15 minutos. Em seguida, foram colocados em banho de gelo por 5 minutos. 300 µL da mistura foi transferida para um microtubo de 1,5 ml, adicionando 300 µL de butanol (1:1). Os microtubos foram agitados no vórtex e centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm, a 4°C. Após a centrifugação, 200 µL do sobrenadante foi recolhido e colocado em uma microplaca de 96 poços. O branco é composto por 250 µL de água e todos os reagentes nas quantidades descritas, enquanto a curva é preparada a partir de uma diluição seriada. A leitura será realizada em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de TBARS será determinada baseada na equação da reta, segundo a lei de Lambert Beer, onde será utilizado 1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como padrão. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.7 Perfil antioxidante hepático

4.7.1. Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Para a atividade da superóxido dismutase homogeneizou-se 100 mg de tecido hepático em 1 mL de tampão HEPES 20 mM, gelado, pH 7,2. O homogenato foi centrifugado (Centribio) a $10.000 \times g$ por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, 30 µL do homogenato diluído (1,5 µL de homogenato + 28,5 µL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) foram pipetados na placa, seguido de 99 µL do tampão de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, 6 µL de MTT e 15 µL de Pirogalol. Para o branco foram usados 144 µL de tampão de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e 6 µL de MTT. Já para o padrão foram adicionados 129 µL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, 6 µL de MTT e 15 µL de pirogalol. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 5 minutos, seguida da adição de 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para parar a reação. A absorbância foi medida a 570 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Para a realização dos cálculos, foram utilizadas as proteínas totais obtidas pelo método de Lowry. A absorbância da amostra foi dividida pela absorbância do padrão, multiplicando pelo fator de diluição. O valor encontrado foi dividido pela quantidade de proteínas totais.

4.7.2. Atividade da enzima Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada em sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado (Centribio) a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Na cubeta do espectrofotômetro (Biospectro), de comprimento de onda 240nm, foram pipetados 990 µL do mix de peróxido de hidrogênio, seguido de 10 µL de homogenato, sendo homogeneizados com a ponteira da pipeta. As leituras foram realizadas em zero, trinta e sessenta segundos. Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1mol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto. A atividade dessa enzima é representada em µmol/mL de amostra. A absorvância utilizada para o cálculo será o delta obtido das três absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial). A fórmula utilizada foi:

U/ mg de proteína = $\Delta \text{ ABS} / \text{min} \times \text{diluição} / \text{volume (ml)} \times \text{coeficiente de extinção molar} \times \text{mg de proteína.}$

4.7. 3. Glutationa total e reduzida

A glutatona total intracelular e o dissulfeto de glutatona (GSSG), em sua forma oxidada (GSSG), foram determinados a partir do homogenato do fígado pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB) proposto por (GRIFFITH, 1980). Esse experimento utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado em espectrofotômetro a 412 nm.

Em primeiro lugar, o homogenato foi centrifugado (Centribio) a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, para que o sobrenadante coletado pudesse ser utilizado para a dosagem.

Para a dosagem da glutatona total, 10 µL do sobrenadante foram pipetados em uma microplaca de 96 poços, sendo adicionado, em seguida, 150 µL da mistura de trabalho [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 glutatona redutase e 0,24% de ácido sulfossalicílico]. Para o branco, foram colocados 10 µL de Ácido Sulfossalicílico 5% (SSA) e 150 µL de Mistura de Trabalho. Já para a curva padrão, foram colocados 10 µL de amostra e 150 µL de Mistura de Trabalho. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Por conseguinte, 50 µL de NADPH (0,16 mg/mL) foram adicionados em todos os poços.

As leituras das absorvâncias foram realizadas a cada minuto, por 5 minutos a 412 nm, em um leitor de ELISA (Biotek ELx808).

Para a dosagem da GSSG, o procedimento é muito parecido com o adotado para a glutathiona total, no entanto, a amostra passou por uma etapa de derivatização antes da dosagem. Nesse processo, adicionou-se 2 μ L de 2-vinilpiridina a 100 μ L do homogenato hepático e os microtubos foram levados ao vórtex. O pH dessa solução foi ajustado para valores entre 6 e 7 utilizando trietanolamina (TEA). Após uma incubação de 60 minutos, as amostras derivadas foram utilizadas no ensaio de acordo com o mesmo procedimento descrito acima. Nesse caso, uma nova diluição seriada foi realizada para determinação dos pontos de curva de calibração, determinando, em seguida, a sua equação da reta que foi utilizada para determinar as concentrações de glutathiona oxidada em nmoles por ml de amostra. O mesmo aconteceu com a glutathiona total. Subtraindo-se o valor da primeira absorvância da última, foram encontrados os valores da GSH e da GSSG, que foram, em seguida, multiplicados pelo fator de diluição respectivo. A glutathiona reduzida foi obtida subtraindo-se o valor de glutathiona oxidada do valor de glutathiona total.

4.8 Análise Estatística

Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro Wilk. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste ANOVA Two Way, seguida do pós-teste de Bonferroni e os resultados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). Os dados não paramétricos foram expressos como mediana \pm intervalo interquartil (IRQ). As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos parâmetros murinométricos e de consumo alimentar

Quadro 2 - Avaliação do perfil murinométrico e dos parâmetros de consumo alimentar em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

	8 semanas		16 semanas		Efeito do tempo p-valor	Efeito da dieta p-valor	Efeito da interação p-valor
	C	HF	C	HF			
Ganho de peso total (g)	7,373 ± 1,488	7,895 ± 1,064	12,30 ± 1,884 ^a	16,54 ± 3,188 ^{b,c}	<0,0001****	0,0005***	0,0052**
Índice de Adiposidade (%)	4,879 ± 1,251	5,632 ± 2,185	6,430 ± 1,503	8,140 ± 1,831 ^b	0,0003***	0,0204*	0,3544
CEA	0,043 ± 0,007	0,046 ± 0,007	0,035 ± 0,006 ^a	0,027 ± 0,005 ^{b,c}	<0,0001****	0,1279	0,0021**
CGPCC	0,011 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,009 ± 0,002	0,010 ± 0,003	0,0746	0,8744	0,1110

Legenda: Avaliação dos parâmetros de consumo alimentar em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão e foram analisados pela análise ANOVA Two Way, seguida do pós-teste de Bonferroni (n=8). Fonte: elaboração própria, 2025. CEA (coeficiente de eficiência alimentar), CGPCC (coeficiente de ganho de peso por consumo calórico).

^a Representa diferença significativa quando comparado ao grupo de dieta controle em 8 semanas (C 8s).

^b Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 8 semanas (HF 8s).

^c Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta controle 16 semanas (C 16s).

^d Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 16 semanas (HF 16s).

Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$; $p < 0,0001^{****}$.

O efeito das variáveis independentes (dieta e tempo) sobre o ganho de peso, índice de adiposidade, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) dos camundongos foi avaliado e os resultados estão descritos no QUADRO 2.

Quando analisamos o ganho de peso total dos camundongos, percebe-se que a dieta, o tempo de exposição e a interação entre as variáveis aumentaram significativamente esse parâmetro no grupo Controle 16 semanas em comparação ao grupo Controle 8 semanas e no grupo HF 16 semanas em comparação aos grupos Controle 16 semanas e HF 8 semanas. Ao contrário do que foi descrito por Sheng et al. (2019), que observaram ganho de peso em camundongos C57BL/6 após 8 semanas de dieta hiperlipídica com 40% de gordura saturada, em nosso estudo esse efeito só foi detectado após 16 semanas (Sheng et al., 2019). Essa divergência pode ser atribuída, ao menos em parte, ao menor teor de gordura presente na dieta utilizada em nosso modelo experimental.

A literatura apresenta resultados semelhantes a nossa pesquisa, como um estudo com camundongos C57BL/6 observou que o padrão alimentar hiperlipídico (60%) aumentou significativamente o peso corporal dos animais no tempo de dezesseis semanas, quando comparado a períodos inferiores, além de demonstrar que o ganho de peso foi maior no grupo HF em comparação ao grupo controle (Nagy e Einwallner, 2018). Sendo assim, pode-se concluir que a exposição prolongada a uma dieta hiperlipídica, mesmo com um menor percentual de lipídios em relação ao valor energético total (VET), é capaz de promover o aumento do ganho de peso nesses animais.

Em relação ao índice de adiposidade, observou-se que ambas as variáveis independentes (dieta e tempo) influenciaram significativamente esse parâmetro nos animais, embora o pós-teste tenha revelado um aumento significativo do índice de adiposidade apenas no grupo HF 16 semanas quando comparado ao grupo HF 8 semanas. Além disso, não foi identificada interação entre essas variáveis.

Em um estudo de doze semanas com camundongos C57BL/6 machos, alimentados com dieta hiperlipídica (60%), o índice de adiposidade apresentou-se significativamente maior no grupo HF do que no grupo controle (Pereira et al., 2018). Em nosso estudo, essa divergência pode ser explicada pelo menor percentual de lipídios utilizados, que pode não ter sido suficiente para desencadear diferença significativa em tempos mais curtos de exposição à dieta.

Somado a isso, é importante destacar que a dieta padrão AIN-93 utilizada possui um elevado percentual de carboidratos em sua composição. Estudos já têm demonstrado o impacto da sua ingestão na glicemia e peso dos animais de forma semelhante à dietas hipercalóricas, o que pode ter sido um viés de confusão dessa variável (Ferreira et al., 2015). Diante do exposto, pode-se concluir que o tempo de exposição contribui para aumentar significativamente o índice de adiposidade em dietas hipercalóricas.

O CEA é um parâmetro que avalia a relação entre o ganho de peso e o consumo alimentar. Ao observar os dados do QUADRO 2, pode-se observar um efeito significativo da variável tempo de exposição à dieta na redução desse parâmetro, além da presença de interação entre as variáveis dieta e tempo. A análise do pós-teste indicou uma redução significativa do CEA no grupo HF 16 semanas em comparação com o grupo HF 8 semanas e com o grupo controle 16 semanas. Apesar do menor consumo alimentar no grupo HF 16 semanas, foi verificado um aumento significativo no ganho de peso nestes animais. Seguindo a mesma linha do CEA, o CGPCC, apresentado no QUADRO 2, que representa a relação entre peso do camundongo e as calorias consumidas, não sofreu nenhum efeito da dieta, do tempo de exposição ou da interação dessas variáveis, indicando que o teor calórico consumido não induziu o ganho de peso significativo nos animais. Assim, de modo geral, apesar dos animais terem ganhado peso significativamente, pode-se concluir que não foi o suficiente para alterar os parâmetros de CEA e CGPCC. Esses achados, analisados em conjunto, indicam que não apenas a quantidade de alimento e energia ingeridos, mas principalmente o perfil qualitativo da dieta, caracterizado pelo elevado teor de gordura saturada, exerce impacto direto na eficiência do armazenamento de energia e na regulação do peso corporal. Sabe-se que dietas ricas em gordura, principalmente saturada, podem aumentar a eficiência de armazenamento de energia, reduzir a termogênese, alterar a microbiota intestinal, modular hormônios da saciedade, entre outros mecanismos (Shi et al., 2023). Assim, nossos resultados reforçam que a composição da dieta é um fator determinante para a manutenção do peso, independentemente da quantidade de alimento consumida e/ou das calorias fornecidas. Essas observações abrem perspectivas para uma compreensão mais aprofundada da complexidade dos processos de regulação metabólica, os quais podem ir além do simples balanço energético.

5.2 Avaliação de Alterações Metabólicas séricas: Glicose, Insulina, Colesterol Total e Triglicerídeos

Quadro 3 - Avaliação dos parâmetros metabólitos séricos em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

	8 semanas		16 semanas		Efeito do tempo p-valor	Efeito da dieta p-valor	Efeito da interação p-valor
	C	HF	C	HF			
Glicose	122,8 ± 4,95	119,2 ± 7,47	122,5 ± 4,34	121,6 ± 7,4	0,6466	0,3184	0,5556
Insulina	0,6406 ± 0,15	0,7239 ± 0,11	0,9057 ± 0,087	1,259 ± 0,29 ^{b,c}	<0,0001 ****	0,0047**	0,0659
HOMA IR	0,8781 (0,4738 - 2,638)	0,7998 ± 0,44	1,675 (1,132 - 2,300)	3,325 ± 1,47 ^{b,c}	<0,0001 ****	0,0114*	0,0114*
Colesterol Total	86,75 ± 16,42	91,83 ± 19,64	113,6 ± 11,85	148,9 ± 19,99 ^{b,c}	<0,0001 ****	0,0097**	0,0448*
Triglicerídeos	38,42 ± 11,05	38,27 ± 8,43	48,57 ± 18,66	22,96 ± 7,66 ^c	0,5973	0,0132*	0,0142*

Legenda: Avaliação dos parâmetros metabólitos séricos em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão para dados paramétricos e mediana ± intervalo interquartil para os não paramétricos. Foram analisados pela análise ANOVA Two Way, seguida do pós teste de Bonferroni (n=8). Fonte: elaboração própria, 2025.

^a Representa diferença significativa quando comparados ao grupo de dieta controle em 8 semanas (C 8s).

^b Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 8 semanas (HF 8s).

^c Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta controle 16 semanas (C 16s).

^d Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 16 semanas (HF 16s).

Diferenças significativas foram consideradas quando p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****.

A determinação de glicose sérica é uma importante análise bioquímica do sangue que irá indicar a concentração plasmática desse metabólito e a capacidade do organismo de regular os níveis de glicose extracelular. Quando há concentrações elevadas de glicose no sangue pode significar quadros de pré diabetes, diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2. Vários fatores, como genética e alimentação, podem ser responsáveis pela menor produção ou diminuição da sensibilidade à insulina, hormônio produzido pelo pâncreas, responsável por regular a entrada da glicose nas células (Sun et al., 2021).

Ao analisar a concentração de glicose encontrada neste estudo, apresentada no QUADRO 3, observa-se que a dieta, o tempo de exposição e a interação dessas variáveis não tiveram efeito na concentração desse metabólito sérico, visto que o grupo controle apresentou valores próximos do grupo HF e que os animais que consumiram a dieta por dezesseis semanas não possuem valores de glicemia mais elevados do que os animais expostos por oito semanas. Em oposição aos nossos resultados, um estudo realizado por Spezani et al. (2020) em camundongos C57BL/6 machos, alimentados com dieta hiperlipídica de 50% durante oito semanas, apresentou diferença significativa entre o grupo HF e o grupo controle para o aumento da glicose sérica. O mesmo ocorreu em um outro estudo que utilizou um tempo de exposição maior de dezoito semanas e uma dieta de 45% de banha de porco (Bezan, 2019). Sendo assim, com esses achados, torna-se claro que uma dieta hiperlipídica e o tempo de ingestão são capazes de condicionar um aumento da glicemia, entretanto, em nosso estudo, a menor porcentagem de gordura na composição da dieta (30%) e a composição, naturalmente, maior de glicídios da dieta controle podem ter colaborado para que diferenças significativas não fossem observadas.

É importante ressaltar que a escolha por utilizar apenas 30% do VET proveniente de gordura saturada teve como objetivo evitar que a dieta fosse classificada como *low carb*. Isso porque, ao aumentar o percentual de gordura, ocorre uma redução proporcional no teor de carboidratos, o que poderia atuar como um viés de confusão na interpretação dos resultados.

Além disso, a proposta do estudo foi desenvolver dietas controle e hiperlipídica que não tivessem uma diferença calórica significativa, a fim de minimizar o impacto de um possível viés calórico nas alterações metabólicas observadas. Dessa forma, buscou-se enfatizar os efeitos qualitativos da composição lipídica da dieta, e não apenas seu conteúdo energético total. Sendo assim, para manter uma diferença calórica menor que 20% entre a dieta controle e HF, optou-se por manter em 30% a quantidade de lipídios da dieta.

A dosagem de insulina sérica é um marcador bioquímico responsável por indicar a quantidade de insulina no sangue, em que níveis elevados podem indicar resistência à insulina e presença de diabetes mellitus tipo 2. A resistência à insulina pode ser explicada pelo prejuízo na sinalização hormonal em razão da ingestão exacerbada de gorduras saturadas (Ma et al., 2024). Em nosso estudo, houve efeito da dieta e do tempo de exposição sobre esse parâmetro. Isso porque, pode-se observar, através do pós-teste, que o grupo HF 16 semanas apresentou-se significativamente aumentado em relação aos grupos HF 8 semanas e Controle 16 semanas.

Resultado semelhante foi observado em um estudo, no qual camundongos C57BL/6 machos alimentados com uma dieta rica em lipídios (40%) por oito semanas apresentaram insulina sérica maior que a dos camundongos alimentados com dieta controle, mas sem diferenças significativas, indicando que, mesmo com uma maior porcentagem de lipídios, oito semanas não foram suficientes para elevar significativamente os níveis de insulina no sangue (Rodrigues, 2020). Já em um experimento de 12 semanas, os camundongos C57BL/6j, também alimentados com dieta hiperlipídica de 40%, apresentaram hiperinsulinemia quando comparados aos camundongos que foram expostos à dieta controle, de forma significativa, resultado este que é semelhante ao nosso estudo (Radlinger et al., 2023). Com isso, pode-se afirmar que o tempo e a dieta podem induzir a uma hiperinsulinemia significativa, possivelmente em razão da desregulação da disfunção metabólica causada pelo consumo elevado de gorduras saturadas (Chen et al., 2020).

Somado a isso, através dos resultados obtidos de insulina e glicose sérica foi possível calcular a avaliação de resistência à insulina (HOMA-IR), apresentada no QUADRO 3. Percebe-se, portanto, que houve efeito da dieta, do tempo e da interação dessas variáveis sobre o parâmetro analisado. Nesse contexto, o pós-teste demonstrou aumento significativo do grupo HF 16 semanas em comparação ao grupo HF 8 semanas e Controle 16 semanas mesmo sem ter ocorrido alterações na glicemia desses camundongos. Esse cenário explica a hiperinsulinemia significativa apresentada pelo mesmo grupo. Sendo assim, pode-se inferir que a dieta hiperlipídica quando consumida de forma crônica desencadeia uma resistência à insulina em comparação à dieta controle e a ingestão por um período menor de tempo.

O colesterol total sérico é uma dosagem responsável por avaliar a quantidade de colesterol presente em lipoproteínas de muito baixa, baixa e alta densidade (VLDL, LDL e HDL, respectivamente). No QUADRO 3, pode-se observar que o tempo, a dieta e a interação dessas variáveis aumentaram significativamente o colesterol total. De forma específica, o pós-

teste mostrou que houve um aumento significativo no grupo HF 16 semanas em comparação aos grupos Controle 16 semanas e HF 8 semanas. Diferente do nosso estudo, um experimento onde os camundongos C57BL/6 foram alimentados com uma dieta composta por 40% de gordura durante oito semanas, os níveis de colesterol total foram significativamente maiores quando comparados a uma dieta controlada (Sheng et al., 2019). Um outro estudo que avaliou a ingestão da dieta hiperlipídica (60%), durante dez semanas, em camundongos C57BL/6J, encontrou diferenças significativas desse grupo em relação ao grupo controle, o que se assemelha ao nosso achado de que, mesmo apresentando menores percentuais de lipídios, o padrão alimentar HF utilizado foi eficaz para induzir elevação nos níveis de colesterol total, assim como o tempo e a interação das variáveis independentes também colaboram para esse aumento (Wang et al., 2021). Esse resultado se dá pelo excesso de ácidos graxos ingeridos, como ocorre no grupo HF, que ao chegarem no fígado são usados para a produção do VLDL e, posteriormente, LDL, que são exportados para a corrente sanguínea.

Os triglicerídeos são moléculas formadas por ácidos graxos e glicerol, sendo responsáveis por armazenar energia. A dosagem dessa molécula no sangue, apresentada no QUADRO 3, demonstrou um padrão diferente em relação aos parâmetros anteriores. A dieta e a interação entre as variáveis reduziram significativamente a concentração de triglicerídeos no grupo HF 16 semanas em comparação ao grupo Controle 16 semanas. Apesar da variável tempo não ter causado nenhum efeito significativo na dosagem de triglicerídeos, é possível observar que o grupo HF 8 semanas apresenta concentrações maiores do que o grupo HF 16 semanas, mas sem diferença significativa encontrada pelo pós teste estatístico.

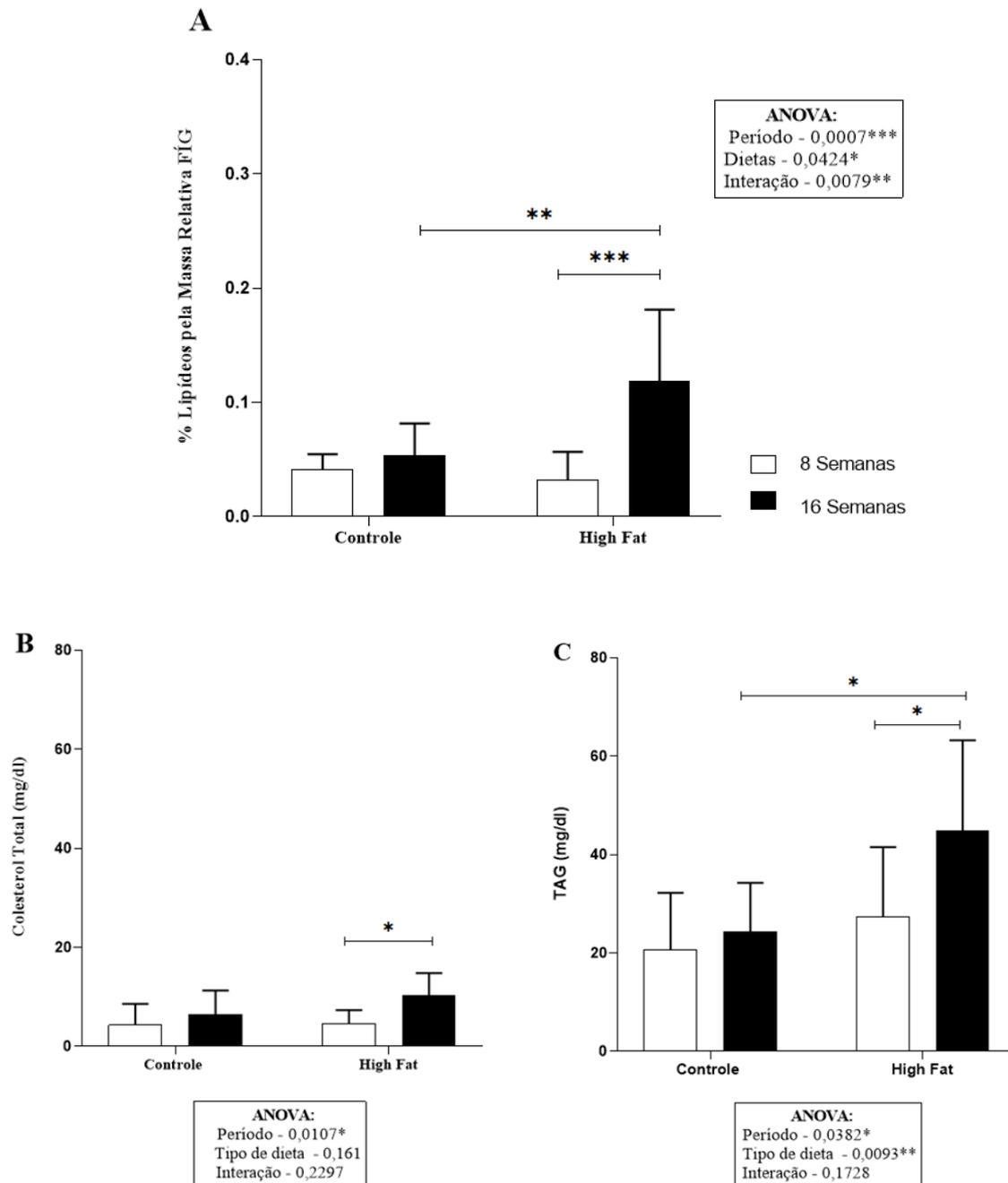
Em conformidade ao nosso estudo, um experimento com camundongos C57BL/6, alimentados com dieta hiperlipídica (60%) por 14 semanas, apresentou níveis séricos de triglicerídeos muito semelhantes entre os dois grupos estudados, assim como ocorreu no tempo de oito semanas (Lee et al., 2019). Já em um estudo com camundongos C57Bl/6 alimentados com uma dieta composta por 45% de gordura por 12 semanas, foi observado a concentração de triglicerídeos séricos mais elevados no grupo controle do que no grupo *High Fat*, com diferenças significativas, assim como ocorreu em nosso estudo no tempo de dezesseis semanas (Rezende, 2020).

Dessa forma, observa-se que uma dieta rica em lipídios não necessariamente aumenta os níveis séricos de triglicerídeos em comparação a uma dieta controlada. A redução dos níveis de triglicerídeos séricos observada em estudos com dietas hiperlipídicas pode estar associada ao maior efluxo desse metabólito para depósito no fígado ou, até mesmo, no tecido adiposo. No entanto, para confirmar essa hipótese, mais estudos são necessários, incluindo a dosagem do perfil lipídico intra-hepático.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a dieta, o tempo e a interação entre as variáveis contribuíram significativamente para desencadear alterações no perfil metabólico, que são fatores importantes para o desenvolvimento da Doença hepática gordurosa metabólica (DHGM).

5.3 Avaliação do perfil lipídico no fígado

Figura 4 - Avaliação do perfil lipídico no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.



Legenda: (A) Porcentagem de lipídios pela massa relativa do fígado (B) Colesterol Total (C) Triglicerídeos (TAG). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão e foram analisados pela análise ANOVA Two Way, seguida do pós teste de Bonferroni (n=8). * refere-se a diferenças significativas, que foram consideradas quando $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****. Fonte: elaboração própria, 2025.

Para avaliação do perfil lipídico do fígado foram realizadas as análises do percentual de lipídios pela massa relativa do fígado, colesterol total e triglicerídeos (TAG), ambos dosados no fígado. O percentual pela massa relativa do fígado, exposto na FIG.4A, consiste na proporção de gordura encontrada no fígado, em relação à massa relativa desse órgão. Pode-se observar que o tempo de exposição, a dieta e a interação entre as variáveis aumentaram significativamente esse parâmetro no grupo HF 16 semanas em comparação aos grupos Controle 16 semanas e HF 8 semanas.

A literatura corrobora com esse achado, como por exemplo em um estudo de doze semanas, em que camundongos C57BL/6 machos, expostos a uma alimentação hiperlipídica de 34,9% de gordura saturada, apresentaram aumento significativo da gordura hepática em comparação ao grupo que recebeu uma dieta padrão (Zhao et al., 2024). Diante do exposto, percebe-se que a dieta elevada em gorduras saturadas e o período mais longo de ingestão pode aumentar o depósito de gorduras no fígado, quando comparada a uma ingestão por um tempo menor ou a um padrão alimentar normolipídico.

A análise de colesterol total no fígado, FIG.4B, demonstra que apenas o período de exposição à dieta alterou significativamente a concentração de colesterol total no fígado no grupo HF 16 semanas em comparação ao grupo HF 8 semanas. O grupo controle apresentou um aumento desse parâmetro mediado pelo efeito do tempo (C16s vs C8s), entretanto, o pós teste estatístico não encontrou diferença significativa.

Por fim, o tempo e a dieta aumentaram de forma significativa a concentração de triglicerídeos (TAG) no fígado, FIG.4C, no grupo HF 16 semanas quando comparado aos grupos HF 8 semanas e Controle 16 semanas. No grupo controle é possível verificar o efeito do tempo (C16s vs C8s), entretanto não significativamente. Assim também, é possível verificar o efeito da dieta mesmo no tempo de oito semanas (HF8s vs C8s), mas também sem diferença estatística. Embora não existam muitos estudos que realizem essa comparação temporal, ela é importante para nos mostrar que uma alimentação alta em gordura saturada pode apresentar um maior depósito de TAG ectópico a depender do seu tempo de duração.

Diferente do nosso estudo, um experimento com camundongos machos C57BL/6, expostos por oito semanas a uma dieta hiperlipídica (40% de gordura), apresentou aumento significativo do colesterol total e TAG no fígado quando comparados a um padrão alimentar controlado (Sheng et al., 2019). Uma explicação para isso pode ser a quantidade de gordura

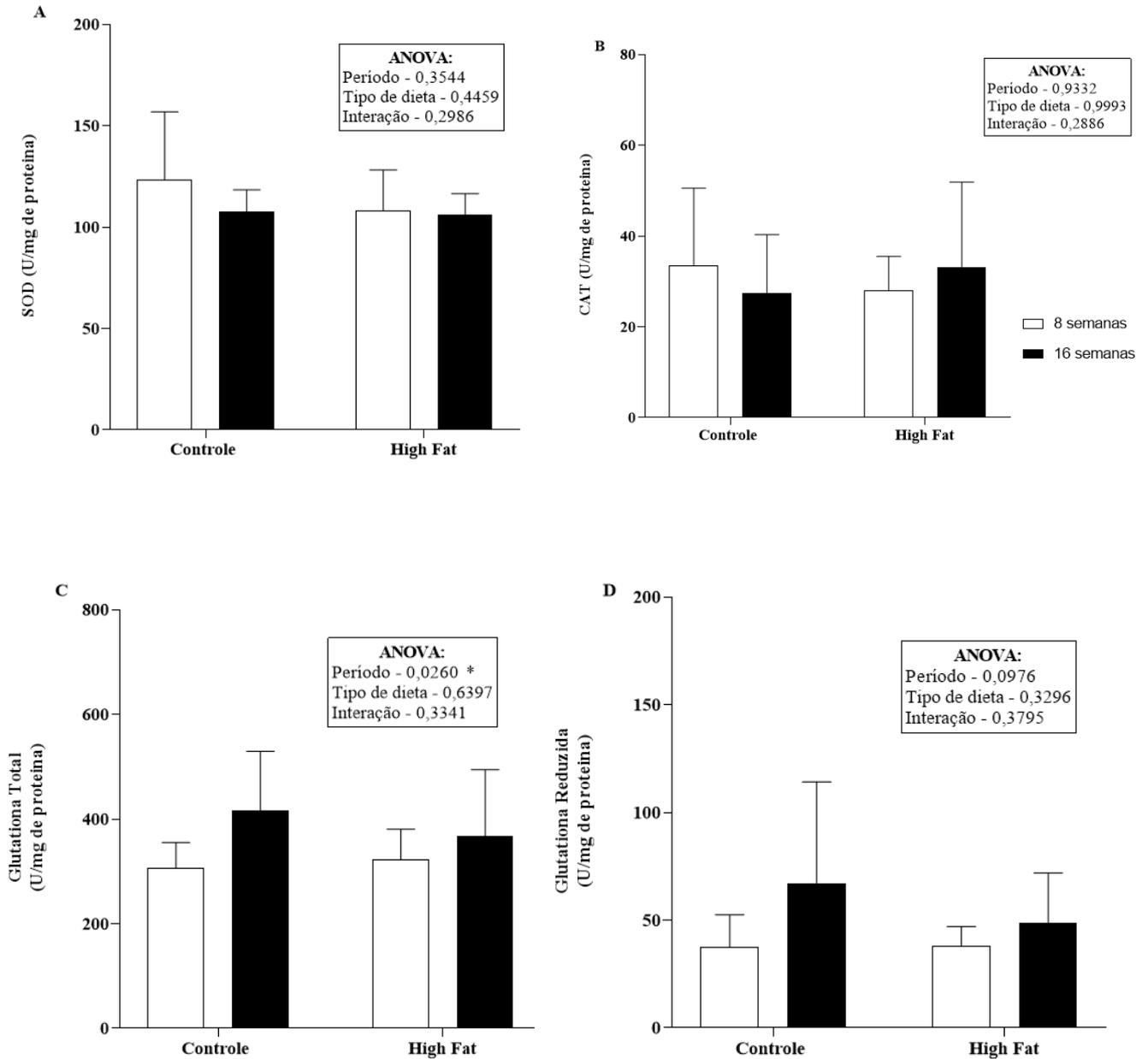
utilizada, em que 30% de gordura saturada pode não ter sido suficiente para induzir um aumento significativo da deposição de colesterol total e TAG hepáticos nesse período mais curto.

Um outro estudo avaliou a concentração de colesterol total e TAG no fígado de camundongos C57BL/6J machos, alimentados com padrão alimentar alto em gorduras (60%), durante dezesseis semanas, em que houve aumento estatisticamente significativo desses parâmetros em comparação ao grupo controle (Li et al., 2022). Em relação ao TAG, esse estudo mostra resultados semelhantes ao nosso, no entanto, a dosagem de colesterol total apenas apresentou aumento significativo em comparação ao menor tempo de exposição, o que pode ser justificado pelo menor percentual de gordura utilizado. Sendo assim, torna-se claro que mesmo com um percentual menor de gordura (30%), a dieta e o período de exposição induziram uma maior deposição de lipídios no tecido hepático.

Esse aumento na deposição de gordura no fígado, evidenciada aqui pela dosagem de TAG, colesterol total e pelo percentual de lipídios pela massa relativa do fígado, pode ser explicada por mecanismos que afetam o metabolismo lipídico. Um desses processos é a resistência à insulina, demonstrada pelo índice HOMA-IR, que aumenta a entrada de ácidos graxos no fígado, em razão da lipólise aumentada nos adipócitos e aumento da lipogênese hepática a partir da glicose. Outra justificativa é o estresse causado no retículo endoplasmático (RE) pelos níveis elevados de ácidos graxos, levando a uma inibição da secreção da proteína apoB100, e, conseqüentemente, diminuição na excreção do VLDL, fazendo com que esses lipídios sejam depositados no tecido hepático (Badmus et al., 2022; Li et al., 2022).

5.4 Avaliação do perfil antioxidante no fígado

Figura 5 - Avaliação do perfil antioxidante no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.



Legenda: (A) Superóxido dismutase (SOD) (B) Catalase (CAT) (C) Glutathione Total (D) Glutathione Reduzida. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (paramétricos), sendo analisados pela análise ANOVA Two Way, seguida do pós teste de Bonferroni (n=8). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$; $p < 0,0001^{****}$. Fonte: elaboração própria, 2025.

Para avaliação do estresse oxidativo, decorrente do aumento da deposição de gordura no fígado, foram analisadas as enzimas antioxidantes hepáticas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona total e glutatona reduzida (GSH).

A dosagem da enzima SOD (FIG.5 A) tem como objetivo determinar a sua atividade no tecido hepático, para constatar a presença de desequilíbrio redox, visto que ela é responsável pela dismutação do radical $O_2\cdot^-$ para peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ao analisar o gráfico percebe-se que o tempo de exposição, a dieta e a interação entre as variáveis não alteraram significativamente sua atividade, ou seja, a alimentação hiperlipídica e a ingestão prolongada dessa dieta não induziu mudanças na atividade dessa enzima em comparação a uma dieta controle e um período mais curto de oito semanas.

Resultados semelhantes foram encontrados em um experimento que expôs, durante doze semanas, camundongos C57BL/6 machos, a uma alimentação hiperlipídica de 34,9% de gordura saturada. Ao analisarem a atividade de SOD hepática, constataram que não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (Zhao et al., 2024). Da mesma forma, em um estudo de dezesseis semanas, usando uma dieta com 60% de gorduras em camundongos machos C57BL/6 também não encontrou alteração na enzima SOD em comparação ao grupo que recebeu a dieta normolipídica (Chu et al., 2022). Diante do exposto, pode-se concluir que mesmo com a utilização de uma concentração maior de gordura na composição da dieta, dezesseis semanas podem não ser suficientes para encontrar mudanças na atividade da enzima SOD, de forma significativa, o que indicaria um desequilíbrio redox.

Outra enzima antioxidante comumente observada para determinação do perfil redox é a CAT, apresentada na FIG.5 B. Sua função é a decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Apesar de poder ser observado um aumento da atividade dessa enzima no grupo HF 16 semanas quando comparada aos grupos HF 8 semanas e C 16 semanas, o pós teste estatístico não detectou efeitos significativos da dieta, tempo ou da interação dessas variáveis.

Em oposição ao nosso estudo, um experimento com camundongos C57BL/6, expostos à dieta hiperlipídica (42%) por doze semanas, relatou que a enzima CAT apresentou-se significativamente reduzida em comparação com o grupo controle (Xia et al., 2019). Em um outro estudo, com características semelhantes ao nosso, de dezessete semanas com camundongos C57BL/6, alimentados com uma dieta alta em gordura (35%), a concentração de

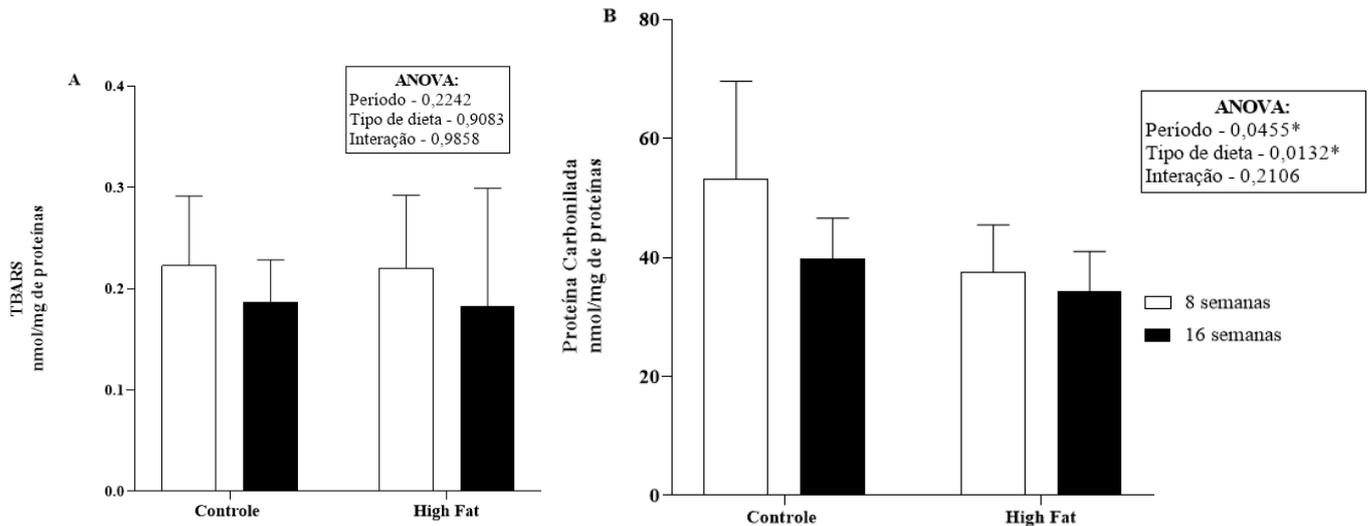
CAT foi também significativamente menor que a do grupo controle, indicando que um possível estresse oxidativo (Motta et al., 2022).

Por fim, foram analisadas as concentrações de glutathiona total (FIG.5 C) e glutathiona reduzida (GSH) (FIG.5 D) participantes de uma outra via de decomposição de H_2O_2 . Observa-se que para a glutathiona total o período de exposição aumentou a concentração deste tripeptídeo (C16s vs C8s; HF16s vs HF8s), entretanto o pós teste não encontrou diferenças significativas. Já para a glutathiona reduzida, não houve intervenção significativa do período, da dieta ou da interação das variáveis. Da mesma forma que a enzima CAT, no estudo de doze e dezessete semanas citados acima, ambos encontraram reduções significativas em GSH no grupo HF em comparação ao grupo controle, concluindo que o estresse oxidativo realmente ocorreu (Xia et al., 2019; Motta et al., 2022).

Uma possível hipótese para explicar nossos achados é de que desequilíbrios no perfil redox estariam começando a se estabelecer, visto que há uma tendência comum de aumento das enzimas antioxidantes no início do estresse oxidativo e depois uma queda quando este já está bem estabelecido (Chen et al., 2020). Considerando que a quantidade de gordura utilizada na dieta (30%) foi menor do que as normalmente utilizadas nesse tipo de estudo, um maior tempo de observação seria necessário para comprovar se a exposição maior do que dezesseis semanas realmente levaria ao estresse oxidativo.

5.5 Avaliação dos biomarcadores de dano mediado por oxidação no fígado

Figura 6 - Avaliação dos biomarcadores de dano mediado por oxidação no fígado em camundongos alimentados com dietas C (Controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.



Legenda: (A) Ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) Proteína Carbonilada. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão (paramétricos), sendo analisados pela análise ANOVA Two Way, seguida do pós teste de Bonferroni ($n=8$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p<0,05^*$; $p<0,01^{**}$; $p<0,001^{***}$; $p<0,0001^{****}$. Fonte: elaboração própria, 2025.

A peroxidação lipídica (TBARS), apresentada na FIG.6 A, é uma das consequências do estresse oxidativo no tecido hepático. Como não foram observadas alterações significativas nas enzimas antioxidantes, esperava-se que não seriam encontradas concentrações elevadas de TBARS. Os achados da literatura não corroboram com os nossos resultados, como em um estudo onde os camundongos C57BL/6 foram submetidos durante oito semanas a uma dieta com 45% de lipídios, tendo sua concentração de TBARS significativamente aumentada em relação ao grupo controle (Nery et al., 2021). Na mesma linha, um estudo mais longo de dezesseis semanas, que utilizou uma dieta hiperlipídica de 60% de gordura, em camundongos C57BL/6, também encontrou níveis mais elevados de peroxidação lipídica no grupo HF em comparação ao grupo controle (Guan et al., 2023).

Outro mediador de dano oxidativo é a carbonilação de proteínas, observada na FIG.6 B. Da mesma forma em que ocorreu com o TBARS, não foram observadas mudanças significativas, apesar do teste estatístico ter demonstrado efeitos do tempo e da dieta. A

literatura mostra resultados diferentes, em que camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta de 40% de gordura, durante treze semanas, obtiveram aumento na concentração de proteína carbonilada em relação ao grupo controle (Barroso et al., 2019). Sendo assim, pode-se concluir que o perfil alimentar com 30% de gorduras saturadas não foi suficiente para induzir danos mediados por oxidação lipídica e proteica, no período máximo de dezesseis semanas.

Em suma, nossos resultados demonstraram que a dieta elevada em gordura saturada (30%), proveniente da banha de porco, oferecida ao grupo HF, durante o período de oito e dezesseis semanas, foi suficiente para induzir um ganho de peso nos animais e elevar o índice de adiposidade. Além disso, alguns parâmetros metabólicos do sangue também foram alterados, como a insulina e o colesterol total, demonstrando uma hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipercolesterolemia, principalmente quando há uma ingestão crônica. O perfil lipídico do fígado reforçou a hipótese de que a dieta hiperlipídica e o maior tempo de exposição contribuiu para o desenvolvimento da esteatose hepática, visto que, foi detectado um maior depósito de gordura no tecido hepático.

Esse cenário sugere que processos do metabolismo lipídico foram alterados pelo excesso de gordura ingerida, o que, conseqüentemente, contribuiria para o desenvolvimento do estresse oxidativo. Isso porque, o aumento dos ácidos graxos nos hepatócitos favorece uma elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que leva a um desequilíbrio oxidativo, resultando no estresse oxidativo. Dessa forma, seria possível observar, inicialmente, o aumento das enzimas antioxidantes hepáticas e, posteriormente, uma redução somada ao aumento dos danos mediados pela oxidação, representados neste estudo pela peroxidação lipídica (TBARS) e pela carbonilação de proteínas. No entanto, apesar das mudanças nos parâmetros metabólicos séricos e no perfil lipídico hepático, nosso grupo HF não apresentou alterações significativas no perfil antioxidante e, conseqüentemente, também não houve aumento dos biomarcadores TBARS e proteína carbonilada, mesmo com o consumo crônico (dezesseis semanas) da dieta. É importante ressaltar que nossos resultados diferem da literatura, possivelmente devido ao fato de termos utilizado apenas 30% do VET em lipídios. Grande parte dos estudos sobre dietas *High Fat* aumentam o percentual de lipídios em detrimento do consumo de carboidratos, o que aproxima esse manejo dietético mais ao padrão *Low Carb*. Em nosso estudo, buscamos minimizar o efeito da redução de carboidratos para isolar, de forma mais apropriada, o impacto dos lipídios sobre os parâmetros metabólicos e o perfil redox. Seria necessário, portanto, aumentar o tempo de estudo para além das dezesseis semanas para observar se a dieta com esse percentual de lipídio induz ao estresse oxidativo.

Como avanço na discussão do conhecimento relacionado às alterações hepáticas induzidas pela DHGM, este projeto contribuiu com evidências importantes. Embora a literatura descreva que o acúmulo excessivo de lipídios hepáticos em modelos de DHGM esteja frequentemente associado ao aumento do estresse oxidativo, nossos resultados indicaram que, mesmo havendo alterações metabólicas séricas e esteatose significativa induzidas pela dieta hiperlipídica com 30% de banha de porco por 16 semanas, não foi observada elevação dos marcadores de estresse oxidativo hepático. Uma possível explicação para esse achado é que o período de exposição utilizado tenha sido suficiente para promover a instalação da esteatose, mas não para a progressão para estágios mais avançados, como esteato-hepatite, nos quais o desequilíbrio entre mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes se torna mais evidente (Valle et al., 2012). Além disso, o teor moderado de gordura na dieta, aliado à presença de carboidratos, pode ter reduzido a lipotoxicidade mitocondrial, favorecendo a ativação de mecanismos compensatórios antioxidantes. Portanto, nossos achados reforçam que o perfil qualitativo da dieta, a duração da exposição e a capacidade adaptativa do fígado devem ser considerados na interpretação da relação entre acúmulo lipídico e estresse oxidativo na DHGM, destacando a complexidade dessa condição e a importância de modelos experimentais adequados para sua investigação.

Diante desse cenário, pode-se afirmar que as limitações deste estudo são a dieta AIN-93 que, por conter elevados teores de carboidratos em sua composição, dificulta a comparação das modificações metabólicas em comparação com a dieta hiperlipídica (Ferreira et al., 2025). Além disso, o tempo máximo de exposição à dieta hiperlipídica de 16 semanas limita a observação da progressão da DHGM e o possível desenvolvimento do estresse oxidativo. Os recursos financeiros e o tempo disponível para o desenvolvimento das atividades impediram a realização de análises mais robustas que contribuiriam para elucidar a patogenicidade da doença.

Quadro 4 - Resumo dos resultados obtidos em camundongos submetidos ao consumo de dietas C (controle) e HF (high fat) por oito e dezesseis semanas.

		8 semanas		16 semanas		Efeito do tempo p-valor	Efeito da dieta p-valor	Efeito da interação p-valor
		C	HF	C	HF			
Efeitos do consumo alimentar	Ganho de peso total	-	-	↑ ^a	↑ ^{b,c}	****	***	**
	Índice de adiposidade	-	-	-	↑ ^b	***	*	-
	CEA	-	-	↓ ^a	↓ ^{b,c}	****	-	**
	CGPCC	-	-	-	-	-	-	-
Perfil metabólico sérico	Glicemia	-	-	-	-	-	-	-
	Insulina	-	-	-	↑ ^{b,c}	****	**	-
	HOMA IR	-	-	-	↑ ^{b,c}	****	*	*
	Colesterol total	-	-	-	↑ ^{b,c}	****	**	*
	Triglicerídeos	-	-	-	↓ ^c	-	*	*
Perfil lipídico hepático	% de lipídios pela massa relativa	-	-	-	↑ ^{b,c}	***	*	**
	Colesterol total	-	-	-	↑ ^b	*	-	-
	TAG	-	-	-	↑ ^{b,c}	*	**	-
Perfil antioxidante hepático	SOD	-	-	-	-	-	-	-
	CAT	-	-	-	-	-	-	-
	Glut. total	-	-	-	-	*	-	-
	GSH	-	-	-	-	-	-	-
Marcadores de dano oxidativo	TBARS	-	-	-	-	-	-	-
	Proteína carbonilada	-	-	-	-	*	*	-

Legenda: setas para cima indicam aumento significativo, setas para baixo indicam diminuição significativa e traço indica alteração não significativa. **Fonte:** Elaboração própria, 2025.

^a Representa diferença significativa quando comparados ao grupo de dieta controle em 8 semanas (C 8s).

^b Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 8 semanas (HF 8s).

^c Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta controle 16 semanas (C 16s).

^d Representa diferença significativa quando comparado com o grupo de dieta hiperlipídica 16 semanas (HF 16s).

Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$; $p < 0,0001^{****}$.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que nossa hipótese alternativa foi parcialmente confirmada, uma vez que o consumo de uma dieta hiperlipídica com 30% de banha de porco foi eficaz em induzir alterações nos parâmetros metabólicos séricos e acúmulo de lipídios no fígado de camundongos C57BL/6 expostos por tempo prolongado, sem, contudo, modificar o perfil redox hepático. Assim, a exposição prolongada agrava essas alterações e pode contribuir para a progressão da DHGM independentemente do estresse oxidativo. No entanto, estes achados destacam a importância de estudos adicionais para esclarecer o papel dessa relação na evolução da DHGM.

REFERÊNCIAS

- ADOLPH T.E., TILG H. Western diets and chronic diseases. *Nat Med* 30, 2133–2147 (2024). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03165->. Acesso em 08. Jan 2025.
- ACEVEDO-FANI A, SINGH H. Biophysical insights into modulating lipid digestion in food emulsions. *Prog Lipid Res.* 2022 Jan;85:101129. doi: 10.1016/j.plipres.2021.101129. Epub 2021 Oct 25. PMID: 34710489. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34710489/>. Acesso em: 09 jan. 2025.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: *Methods in enzymology*: Elsevier, 1984. v. 105, p. 121- 126. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727660/> . Acesso em: 6 jan. 2025.
- ARAB J.P., ARRESE M., TRAUNER M. Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease Annu. *Rev. Pathol.*, 13 (2018), pp. 321-350, 10.1146/annurev-pathol-020117-043617. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>. Acesso em: 10 jan. 2025.
- BADMUS OO, HILLHOUSE SA, ANDERSON CD, HINDS TD, STEC DE. Molecular mechanisms of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD): functional analysis of lipid metabolism pathways. *Clin Sci (Lond)*. 2022 Sep 30;136(18):1347-1366. doi: 10.1042/CS20220572. PMID: 36148775; PMCID: PMC9508552.
- BARROSO MV, GRAÇA-REIS A, CATTANI-CAVALIERI I, GITIRANA LB, VALENCA SS, LANZETTI M. Mate tea reduces high fat diet-induced liver and metabolic disorders in mice. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:1547-1555. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.007. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30551407. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.007>. Acesso em: 30 Abr. 2025.
- BEZAN, Priscila Nogueira. Effects of supplementation of fructooligosaccharides on metabolites in C57BL mice fed a hyperlipidic diet. 2019. 56 p. Dissertation (Masters in Clinical Medicine) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2813-0464/3/1/8>. Acesso em: 28 Abr. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Cenário da Obesidade no Brasil: Boletim Epidemiológico. abr. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-07.pdf/view>. Acesso em: 09 jan. 2025.
- BRASIL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2023 [recurso eletrônico] / **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de Análise Epidemiológica e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico/view>. Acesso em: 09 jan. 2025.

CHEN Z, TIAN R, SHE Z, CAI J, LI H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radic Biol Med**. 2020 May 20;152:116-141. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025. Epub 2020 Mar 8. Erratum in: *Free Radic Biol Med*. 2021 Jan;162:174. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.011. PMID: 32156524.. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32156524/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

CHU H, DU C, YANG Y, FENG X, ZHU L, CHEN J, YANG F. MC-LR Aggravates Liver Lipid Metabolism Disorders in Obese Mice Fed a High-Fat Diet via PI3K/AKT/mTOR/SREBP1 Signaling Pathway. **Toxins (Basel)**. 2022 Nov 30;14(12):833. doi: 10.3390/toxins14120833. PMID: 36548730; PMCID: PMC9784346. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36548730/>. Acesso em: 30 Abr. 2025.

CLARE K, DILLON JF, BRENNAN PN. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathogenesis of MAFLD. **J Clin Transl Hepatol**. 2022. doi: 10.14218/JCTH.2022.00067. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36304513/>. Acesso em: 07 jan. 2024.

CLEMENTE-SUÁREZ VJ, BELTRÁN-VELASCO AI, REDONDO-FLÓREZ L, MARTIN-RODRIGUEZ A, TORNERO-AGUILERA JF. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. **Nutrients**. 2023 Jun 14;15(12):2749. doi: 10.3390/nu15122749. PMID: 37375654; PMCID: PMC10302286. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2342194>. Acesso em: 08 jan. 2024.

CUPPARI, L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. 4ª ed. São Paulo: Manole, 2019. ISBN 9788520457481. Acesso em: 7 jan. 2025.

DELLI BOVI AP, MARCIANO F, MANDATO C, SIANO MA, SAVOIA M, VAJRO P. Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. **Front Med (Lausanne)**. 2021 Feb 26;8:595371. doi: 10.3389/fmed.2021.595371. PMID: 33718398; PMCID: PMC7952971. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7952971/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

DEMIRCI-ÇEKIÇ, S. et al. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **Elsevier B.V.**, v. 209, 2022. Disponível em: <https://10.1016/j.jpba.2021.11447>. Acesso em: 13 jan. 2025.

DIAS BV, GOMES SV, et al. EPA/DHA and linseed oil have different effects on liver and adipose tissue in rats fed with a high-fat diet. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**. 2022. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2022.106622. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35091082/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Medicine**, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8225017/>. Acesso em: 6 jan. 2025

ESLAM M, SANYAL AJ, GEORGE J. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. **Gastroenterology**, 2020. doi: 10.1053/j.gastro.2019.11.312. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32044314/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

EZHILARASAN D, LAKSHMI T. A. Molecular Insight into the Role of Antioxidants in Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. **Oxid Med Cell Longevity**. 2022. doi: 10.1155/2022/9233650. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2022/9233650>. Acesso em: 7 jan. 2025.

FERREIRA, Patricia Almeida; SALAME, Jéssica Paola; BASTOS, Rodrigo Franco; FRANCISCO, Luciane Severo; FELIX, Anelize de Oliveira Campello; FELIX, Samuel Rodrigues; NOBRE, Márcia de Oliveira. *Considerações sobre a dieta AIN-93M elaborada para modelos biológicos*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 103–108, 2015. Recebido em 23 out. 2015. Aceito em 3 nov. 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/291161670_Consideracoes_sobre_a_dieta_AIN-93M_elaborada_para_modelos_biologico. Acesso em: 05 set. 2025.

FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**. 1957 May;226(1):497-509. PMID: 13428781. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>. Acesso em: 6 jan. 2025.

FOAUAD Y, ALBORAIE M, SHIHA G. Epidemiology and diagnosis of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease. **Hepatol Int**. 2024 Oct;18(Suppl 2):827-833. doi: 10.1007/s12072-024-10704-3. Epub 2024 Jul 5. PMID: 38967907; PMCID: PMC11450050. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38967907/>. Acesso em: 9 jan. 2025.

GARCÍA-MONTERO, C.; FRAILE-MARTÍNEZ, O.; GÓMEZ-LAHOZ, A. M. et al. Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota-Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. **Nutrients**, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33671569/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

GOFTON C, UPENDRAN Y, ZHENG MH, GEORGE J. MAFLD: How is it different from NAFLD? **Clin Mol Hepatol**. 2023 Feb;29(Suppl):S17-S31. doi: 10.3350/cmh.2022.0367. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36443926; PMCID: PMC10029949. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36443926/>. Acesso em: 23 Abr. 2025.

GOMES SV, DIAS BV, et al. High-fat diet increases mortality and intensifies immunometabolic changes in septic mice. **J Nutr Biochemistry**. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36921735/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

GRIFFITH OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**. 1980 Jul 15;106(1):207-12. doi: 10.1016/0003-2697(80)90139-6. PMID: 7416462. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7416462/>. Acesso em: 6 jan. 2025.

GUAN Q, WANG Z, HU K, CAO J, DONG Y, CHEN Y. Melatonin Ameliorates Hepatic Ferroptosis in NAFLD by Inhibiting ER Stress via the MT2/cAMP/PKA/IRE1 Signaling Pathway. **Int J Biol Sci**. 2023 Jul 31;19(12):3937-3950. doi: 10.7150/ijbs.85883. PMID: 37564204; PMCID: PMC10411470. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37564204/>. Acesso em: 30 Abr. 2025.

GUO X, YIN X, LIU Z, WANG J. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Pathogenesis and Natural Products for Prevention and Treatment. **Int J Mol Sci**. 2022 Dec 7;23(24):15489. doi: 10.3390/ijms232415489. PMID: 36555127; PMCID: PMC9779435. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36555127/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

GUTIÉRREZ S, SVAHN SL, JOHANSSON ME. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. **Int J Mol Sci**. 2019 Oct 11;20(20):5028. doi: 10.3390/ijms20205028. PMID: 31614433;

PMCID: PMC6834330. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6834330/> . Acesso em: 09 jan. 2025.

HASSANI ZADEH S, MANSOORI A, HOSSEINZADEH M. Relação entre padrões alimentares e doença hepática gordurosa não alcoólica: uma revisão sistemática e meta-análise . *J Gastroenterol Hepatol* (2021) 36 (6):1470–8. doi: 10.1111/jgh.15363. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33269500/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

INFANTES-GARCIA MR, Verkempinck SHE, Carrière F, Hendrickx ME, Grauwet T. Pre-duodenal lipid digestion of emulsions: Relevance, colloidal aspects and mechanistic insight. *Food Res Int*. 2023 Jun;168:112785. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112785. Epub 2023 Apr 1. PMID: 37120232. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37120232/>. Acesso em: 09 jan. 2025.

JENNISON E, BYRNE CD. Recent advances in NAFLD: current areas of contention. *Fac Rev*. 2023. doi: 10.12703/r/12-10. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10155199/> . Acesso em: 8 jan. 2025.

LEE MR, YANG HJ, PARK KI, MA JY. Lycopodium lucidum Turcz. ex Benth. attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*. 2019 Mar 1;55:14-22. doi: 10.1016/j.phymed.2018.07.008. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30668424. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30668424/>. Acesso em: 28 Abr. 2025.

LEE KC, WU PS, LIN HC. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis. *Clin Mol Hepatol*. 2023 Jan;29(1):77-98. doi: 10.3350/cmh.2022.0237. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36226471; PMCID: PMC9845678. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36226471/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

LE MH, YEO YH, LI X, LI J, ZOU B, WU Y, YE Q, HUANG DQ, ZHAO C, ZHANG J, LIU C, CHANG N, XING F, YAN S, WAN ZH, TANG NSY, MAYUMI M, LIU X, LIU C, RUI F, YANG H, YANG Y, JIN R, LE RHX, XU Y, LE DM, BARNETT S, STAVE CD, CHEUNG R, ZHU Q, NGUYEN MH. 2019 Global NAFLD Prevalence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Dec;20(12):2809-2817.e28. doi: 10.1016/j.cgh.2021.12.002. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34890795. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34890795/>. Acesso em: 7 jan. 2025.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8015469/>. Acesso em: 6 jan. 2025.

LI Q, TAN JX, HE Y, BAI F, LI SW, HOU YW, JI LS, GAO YT, ZHANG X, ZHOU ZH, YU Z, FANG M, GAO YQ, LI M. Atractylenolide III ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by activating Hepatic Adiponectin Receptor 1-Mediated AMPK Pathway. *Int J Biol Sci*. 2022 Jan 31;18(4):1594-1611. doi: 10.7150/ijbs.68873. PMID: 35280674; PMCID: PMC8898375. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35280674/>. Acesso em: 29 Abr. 2025.

M. ROMERO-GÓMEZ, S. ZELBER-SAGI, M. TRENELL. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J. Hepatology*, 2017. Doi: 10.1016/j.jhep.2017.05.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545937/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

MA J, GAO R, XIE Q, PAN X, TONG N. Whole transcriptome sequencing analyses of islets reveal ncRNA regulatory networks underlying impaired insulin secretion and increased β -cell mass in high fat diet-induced diabetes mellitus. **PLoS One**. 2024 Apr 1;19(4):e0300965. doi: 10.1371/journal.pone.0300965. PMID: 38557554; PMCID: PMC10984535. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38557554/>. Acesso em: 28 Abr. 2025.

MARCINKOWSKA A, GÓRNICKA M. The Role of Dietary Fats in the Development and Treatment of Endometriosis. **Life (Basel)**. 2023 Feb 27;13(3):654. doi: 10.3390/life13030654. PMID: 36983810; PMCID: PMC10058497. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10058497/>. Acesso em: 09 jan. 2025.

MALESZA IJ, MALESZA M, WALKOWIAK J, MUSSIN N, WALKOWIAK D, ARINGAZINA R, BARTKOWIAK-WIECZOREK J, MADRY E. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. **Cells**. 2021 Nov 14;10(11):3164. doi: 10.3390/cells10113164. PMID: 34831387; PMCID: PMC8619527. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34831387/>. Acesso em: 06 jan. 2025.

MIRALLES-PÉREZ B, NOGUÉS MR, SÁNCHEZ-MARTOS V, TALTAUVULL N, MÉNDEZ L, MEDINA I, RAMOS-ROMERO S, TORRES JL, ROMEU M. The Effects of the Combination of Buckwheat D-Fagomine and Fish Omega-3 Fatty Acids on Oxidative Stress and Related Risk Factors in Pre-Obese Rats. **Foods**. 2021 Feb 4;10(2):332. doi: 10.3390/foods10020332. PMID: 33557198; PMCID: PMC7913974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557198/>. Acesso em: 23 maio. 2025.

MORIGUCHI Watanabe L, BERNADES Pereira Delfino H, AUGUSTA de Souza Pinhel M, NORONHA NY, MARIA Diani L, CINTRA do Prado Assumpção L, FERREIRA Nicoletti C, BARBOSA Nonino C. Food and Nutrition Public Policies in Brazil: From Malnutrition to Obesity. **Nutrients**. 2022 Jun 15;14(12):2472. doi: 10.3390/nu14122472. PMID: 35745202; PMCID: PMC9227558.

MOTTA BP, PINHEIRO CG, FIGUEIREDO ID, CARDOSO FN, OLIVEIRA JO, MACHADO RTA, DA SILVA PB, CHORILLIM, BRUNETTI IL, BAVIERA AM. Combined Effects of Lycopene and Metformin on Decreasing Oxidative Stress by Triggering Endogenous Antioxidant Defenses in Diet-Induced Obese Mice. **Molecules**. 2022 Dec 3;27(23):8503. doi: 10.3390/molecules27238503. PMID: 36500596; PMCID: PMC9737677. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36500596/>. Acesso em: 30 Abr. 2025.

NAGY C, EINWALLNER E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). **J Vis Exp**. 2018 Jan 7;(131):56672. doi: 10.3791/56672. PMID: 29364280; PMCID: PMC5908452. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29364280/>. Acesso em: 29 Abr. 2025.

NERY M, FERREIRA PS, GONÇALVES DR, SPOLIDORIO LC, MANTHEY JA, CESAR TB. Physiological effects of tangeretin and heptamethoxyflavone on obese C57BL/6J mice fed a high-fat diet and analyses of the metabolites originating from these two polymethoxylated flavones. **Food Sci Nutr**. 2021 Feb 12;9(4):1997-2009. doi: 10.1002/fsn3.2167. PMID: 33841818; PMCID: PMC8020949. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8020949/>. Acesso em: 30 Abr. 2025.

NEUSCHWANDER -TETRI BA. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Med**. 2017 Feb 28;15(1):45. doi: 10.1186/s12916-017-0806-8. PMID: 28241825; PMCID: PMC5330146. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35745202/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

- NGUYEN P, LERAY V, DIEZ M, SERISIER S, LE BLOC'H J, SILIART B, DUMON H. Liver lipid metabolism. **J Anim Physiol Anim Nutr**, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18477307/>. Acesso em: 9 jan. 2025.
- PAPAKONSTANTINOUE E, OIKONOMOU C, NYCHAS G, DIMITRIADIS GD. Effects of Diet, Lifestyle, Chrononutrition and Alternative Dietary Interventions on Postprandial Glycemia and Insulin Resistance. **Nutrientes**. 2022. doi: 10.3390/nu14040823. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35215472/>. Acesso em: 08 jan. 2025.
- PARADIES G, PARADIES V, RUGGIERO FM, PETROSILLO G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**. 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14205. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25339807/>. Acesso em: 07. jan. 2025
- PARTHASARATHY G, REVELO X, MALHI H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. **Hepato Comm**. 2020 Jan 14;4(4):478-492. doi: 10.1002/hep4.1479. PMID: 32258944; PMCID: PMC7109346. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7109346/>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- PEISELER M, SCHWABE R, HAMPE J, KUBES P, HEIKENWÄLDER M, TACKE F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits. **J Hepatology**, 2022. doi: 10.1016/j.jhep.2022.06.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35750137/>. Acesso em: 07. jan. 2025.
- PEREIRA, J. L. et al. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. **Ciência & Saúde**, v. 11, n. 1, p. 51, 2018. Disponível em: <https://10.15448/1983-652x.2018.1.27672>. Acesso em: 29 Abr. 2025.
- POLOCZEK J, KAZURA W, CHEŁMECKA E, MICHALCZYK K, JOCHEM J, GUMPRECHT J, STYGAR D. Duodenojejunal Omega Switch Surgery Reduces Oxidative Stress Induced by Cafeteria Diet in Sprague-Dawley Rats. **Nutrients**. 2022 Oct 2;14(19):4097. doi: 10.3390/nu14194097. PMID: 36235749; PMCID: PMC9573765. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36235749/>. Acesso em: 23 maio. 2025.
- POUWELS S, SAKRAN N, GRAHAM Y, LEAL A, PINTAR T, YANG W, KASSIR R, SINGHAL R, MAHAWAR K, RAMNARAIN D. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. **BMC Endocr Disord**. 2022 Mar 14;22(1):63. doi: 10.1186/s12902-022-00980-1. PMID: 35287643; PMCID: PMC8919523. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35287643/>. Acesso em: 06 jan. 2025.
- R. BUETTNER, J. SCHÖLMEIERICH, L.C. BOLLHEIMER. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, 2007. doi: 10.1038/oby.2007.608. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17426312/>. Acesso em: 06 jan, 2025.
- RADLINGER, B.; RESS, C.; FOLIE, S.; SALZMANN, K.; LECHUGA, A.; WEISS, B.; SALVENMOSER, W.; GRABER, M.; HIRSCH, J.; HOLFELD, J.; KREMSER, C.; MOSER, P.; STAUDACHER, G.; JELENIK, T.; RODEN, M.; TILG, H.; KASER, S. Empagliflozin protects mice against diet-induced obesity, insulin resistance and hepatic steatosis. **Diabetologia**, v. 66, n. 4, p. 754–767, abr. 2023. doi: 10.1007/s00125-022-05851-x. Epub 16 dez. 2022. PMID: 36525084; PMCID: PMC9947060. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36525084/>. Acesso em: 28 abr. 2025.

RAUBER, FERNANDA; JAIME, PATRICIA CONSTANTE. Políticas públicas de alimentação e nutrição voltadas ao sobrepeso e obesidade. *Políticas públicas de alimentação e nutrição*. Tradução. Rio de Janeiro: Atheneu, 2019. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002933119>. Acesso em 20 jun. 2025.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76: A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993. Disponível em: <https://10.1093/jn/123.11.1939>. Acesso em: 23 maio. 2025.

REZENDE, LARISSA BERNARDES DE. **Efeito do tratamento com óleo de coco na perda óssea de camundongos alimentados com dieta rica em gordura**. 2020. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Ouro Preto, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/34838>. Acesso em: 28 Abr. 2025.

RINALDI L, PAFUNDI PC, GALIERO R, CATURANO A, MORONE MV, SILVESTRI C, GIORDANO M, SALVATORE T, SASSO FC. Mechanisms of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in the Metabolic Syndrome. A Narrative Review. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 10;10(2):270. doi: 10.3390/antiox10020270. PMID: 33578702; PMCID: PMC7916383. Disponível em: <https://www.mdpi.com/993794>. Acesso em: 13 jan. 2025.

ROBEA MA, BALMUS IM, GIRLEANU I, HUIBAN L, MUZICA C, CIOBICA A, STANCIU C, CIMPOESU CD, TRIFAN A. Coagulation Dysfunctions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Oxidative Stress and Inflammation Relevance. *Medicina (Kaunas)*. 2023 Sep 7;59(9):1614. doi: 10.3390/medicina59091614. PMID: 37763733; PMCID: PMC10535217. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37763733/>. Acesso em: 13 jan. 2025.

SAMUEL V.T, SHULMAN G.I. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases. *Cell Metabol.*, 27 (2018), pp. 22-41, 10.1016/j.cmet.2017.08.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.002>. Acesso em: 10 jan. 2025.

SALHI, A., CARRIERE, F., GRUNDY, MML., ALOULOU, A. . Enzimas envolvidas na digestão de lipídios. Em: Grundy, M.ML., Wilde, PJ (orgs.) Bioacessibilidade e digestibilidade de lipídios de alimentos. *Springer*, 2021. Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-56909-9_1. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-56909-9_1#citeas. Acesso em 20 jun. 2025.

SHENG D, ZHAO S, GAO L, ZHENG H, LIU W, HOU J, JIN Y, YE F, ZHAO Q, LI R, ZHAO N, ZHANG L, HAN Z, WEI L. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via activation of AMPK signaling. *Cell Biosci.* 2019 Sep 18;9:77. doi: 10.1186/s13578-019-0339-2. PMID: 31548878; PMCID: PMC6751621. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31548878/>, Acesso em: 28 Abr. 2025.

SHI, H.; PROUGH, R. A.; MCCLAIN, C. J.; SONG, M. Different types of dietary fat and fructose interactions result in distinct metabolic phenotypes in male mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 111, p. 109189, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2022.109189. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36272691/>. Acesso em: 14. Jul. 2025.

SUN Y, TAO Q, WU X, ZHANG L, LIU Q, WANG L. The Utility of Exosomes in Diagnosis and Therapy of Diabetes Mellitus and Associated Complications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Oct 26;12:756581. doi: 10.3389/fendo.2021.756581. PMID: 34764939; PMCID: PMC8576340. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34764939/>. Acesso

em: 28 Abr. 2025.

SPEZANI R, da Silva RR, MARTINS FF, de Souza Marinho T, AGUILA MB, MANDARIM DE LACERDA CA. Intermittent fasting, adipokines, insulin sensitivity, and hypothalamic neuropeptides in a dietary overload with high-fat or high-fructose diet in mice. **J Nutr Biochem**. 2020 Sep;83:108419. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108419. Epub 2020 May 18. PMID: 32580132. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32580132/>. Acesso em: 28 Abr. 2025.

ŚWIDERSKA M., MACIEJCZYK M., ZALEWSKA A., POGORZELSKA J., FLISIAK R., CHABOWSKI A. Oxidative stress biomarkers in the serum and plasma of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Can plasma AGE be a marker of NAFLD? Oxidative stress biomarkers in NAFLD patients. **Free Radical Research**, 2019. doi: 10.1080/10715762.2019.1635691. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31234658/>. Acesso em: 07 jan. 2025.

TROESCH B, EGGERSDORFER M, LAVIANO A, ROLLAND Y, SMITH AD, WARNKE I, WEIMANN A, CALDER PC. Expert Opinion on Benefits of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (DHA and EPA) in Aging and Clinical Nutrition. **Nutrients**. 2020 Aug 24;12(9):2555. doi: 10.3390/nu12092555. PMID: 32846900; PMCID: PMC7551800. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32846900/>. Acesso em: 23 Abr. 2025.

SÁNCHEZ-VALLE, V.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C.; URIBE, M.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p. 4850-4860, 2012. DOI: 10.2174/092986712803341520. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22709007/>. Acesso em: 14. Jul. 2025.

WANG JH, HWANG SJ, LIM DW, SON CG. Cynanchum atratum Alleviates Non-Alcoholic Fatty Liver by Balancing Lipogenesis and Fatty Acid Oxidation in a High-Fat, High-Fructose Diet Mice Model. **Cells**. 2021 Dec 22;11(1):23. doi: 10.3390/cells11010023. PMID: 35011585; PMCID: PMC8750091. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35011585/>. Acesso em: 28 Abr. 2025.

WOLPE SIMAS, L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. página 80, 2019. DOI: 10.31415/bjns.v2i2.53. Disponível em: <https://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/53>. Acesso em: 06 jan. 2025.

World Health Organization WHO Fact Sheet. Healthy Diet. 2018. Disponível em: [healthy-diet-fact-sheet-394.pdf](https://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet-active). Acesso em: 09 jan. 2025.

XIA H, ZHU X, ZHANG X, JIANG H, LI B, WANG Z, LI D, JIN Y. Alpha-naphthoflavone attenuates non-alcoholic fatty liver disease in oleic acid-treated HepG2 hepatocytes and in high fat diet-fed mice. **Biomed Pharmacother**. 2019 Oct;118:109287. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109287. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31401392. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31401392/>. Acesso em: 30 Abr. 2025.

ZHAO P, YANG W, XIAO H, ZHANG S, GAO C, PIAO H, LIU L, LI S. Vitamin K2 protects mice against non-alcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet. **Sci Rep**. 2024 Feb 6;14(1):3075. doi: 10.1038/s41598-024-53644-6. PMID: 38321064; PMCID: PMC10847165. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38321064/>. Acesso em: 29 Abr. 2025.

ZHANH L., WANG X., CUETO R., EFFI C., ZHANG Y., TAN H., QIN X., JI Y., YANG

X., WANG H.. Base bioquímica e interação metabólica da regulação redox. **Redox Biol.**, 26 (2019), pág. 101284, 10.1016/j.redox.2019.101284. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85072368525&origin=inward&txGid=450f95d628930d91ed0bdfac8eff80b6>. Acesso em: 10 jan. 2025.