

Modelo experimental de dieta rica em gordura é útil para avaliar o agravamento dos danos ao fígado associados a comorbidades

Experimental model of high-fat diet is useful to evaluate the aggravation of liver damage associated with comorbidities

El modelo experimental de dieta alta en grasas es útil para evaluar el agravamiento del daño hepático asociado a comorbilidades

Recebido: 16/02/2021 | Revisado: 21/02/2021 | Aceito: 23/02/2021 | Publicado: 03/03/2021

Ayane Araújo Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7792-6993>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: ayanerodrigues2012@hotmail.com

Even Herlany Pereira Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7566-1282>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: even.herlany@gmail.com

Raissa Silva Bacelar de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3476>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: raissa_sba@hotmail.com

Luiz Felipe de Carvalho França

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5361-8603>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: phelpscf@hotmail.com

Larissa dos Santos Pessoa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6723-3069>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: lalipessoa25@hotmail.com

Felipe Rodolfo Pereira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9224-5571>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: feliperodolfo.15@hotmail.com

David Di Lenardo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4302-960X>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: david.dilenardo1260@gmail.com

Hélio Mateus Silva Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1551-8139>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: helio_mateus_@hotmail.com

André dos Santos Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5259-6481>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: fko.andre@gmail.com

Francisca Beatriz de Melo Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5265-2009>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: frcbeatriz.melo@hotmail.com

Victor Brito Dantas Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6932-915X>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: victorbritodantas@gmail.com

André Luiz dos Reis Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6452-9160>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: drluiz@ufpi.edu.br

Jand-Venes Rolim Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7234-3382>
Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil
E-mail: jandvenes@ufpi.edu.br

Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7235-5159>

Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba, Brasil

E-mail: any.vasconcelos@iesvap.edu.br

Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3331-452X>

Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Brasil

E-mail: prof.dr.daniel.vasconcelos@gmail.com

Resumo

Objetivo: Desenvolver um modelo de dieta rica em gordura (DRG) que sozinho não resultou em doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), permitindo estudar a associação de comorbidades com o modelo de dieta rica em gordura. **Material e métodos:** Os ratos foram divididos em 2 grupos: dieta padrão e dieta rica em gordura, cada grupo com 8 animais. Os ratos foram submetidos à análise dos seguintes parâmetros no tecido hepático: dosagem de malondialdeído (MDA), glutathione (GSH) e atividade da mieloperoxidase (MPO). As amostras de fígado também foram avaliadas histopatologicamente quanto aos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FAL), ácido úrico e colesterol total (TC), cálcio (CA), ureia e HDL. **Resultados:** Mostraram que houve diferença significativa em MDA, GSH, colesterol total (CT), ALT, ALB, ácido úrico (AU), cálcio (CA) e HDL. A avaliação histopatológica apresentou escore baixo, insuficiente para a classificação da DHGNA. **Conclusão:** Este estudo demonstrou que o modelo de dieta rica em gordura não causou DHGNA. Esse achado permite utilizar a dieta hiperlipídica caracterizada neste estudo para investigar as possíveis alterações hepáticas causadas por outras comorbidades.

Palavras-chave: Fígado gorduroso; Modelos animais; Dieta; Hepatopatia gordurosa não alcoólica.

Abstract

Objective: Develop a high-fat diet (HFD) model that standing alone did not develop the Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), allowing one to study the association of comorbidities with the high-fat diet model. **Material and methods:** The rats were divided into 2 groups: standard diet and high-fat diet, each group with 8 animals. The rats were submitted to the analysis of the following parameters in hepatic tissue: dosage of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and myeloperoxidase activity (MPO). Liver samples were also assessed histopathologically for serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), alkaline phosphatase (FAL), uric acid and total cholesterol (TC), calcium (CA), urea and HDL. **Results:** The results showed that there was a significant difference in MDA, GSH, total cholesterol (CT), ALT, ALB, uric acid (AU), calcium (CA) and HDL. The histopathological evaluation presented a low score, insufficient for the classification of NAFLD. **Conclusion:** This study demonstrated that the high-fat diet model did not cause NAFLD. This finding allows one to use the high-fat diet characterized in this study to investigate the possible hepatic alterations caused by other comorbidities.

Keywords: Fatty liver; Animal models; Diet; Non-alcoholic fatty liver disease.

Resumen

Objetivo: Desarrollar un modelo de dieta alta en grasas (HFD) que por sí solo no desarrolle la enfermedad del hígado graso no alcohólico (DHGNA), lo que permite estudiar la asociación de comorbilidades con el modelo de dieta alta en grasas. **Material y métodos:** Las ratas se dividieron en 2 grupos: dieta estándar y dieta alta en grasas, cada grupo con 8 animales. Las ratas fueron sometidas al análisis de los siguientes parámetros en tejido hepático: dosificación de malondialdehído (MDA), glutatión (GSH) y actividad mieloperoxidasa (MPO). También se evaluaron histopatológicamente muestras de hígado para determinar los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (FAL), ácido úrico y colesterol total (TC), calcio (CA), urea y HDL. **Resultados:** Los resultados mostraron que hubo una diferencia significativa en MDA, GSH, colesterol total (CT), ALT, ALB, ácido úrico (AU), calcio (CA) y HDL. La evaluación histopatológica presentó una puntuación baja, insuficiente para la clasificación de EHGNA. **Conclusión:** Este estudio demostró que el modelo de dieta alta en grasas no causó NAFLD. Este hallazgo permite utilizar la dieta rica en grasas caracterizada en este estudio para investigar las posibles alteraciones hepáticas provocadas por otras comorbilidades.

Palabras clave: Hígado graso; Modelos animales; Dieta; Enfermedad del hígado graso no alcohólico.

1. Introdução

Os modelos de dieta animal permitem aos pesquisadores controlar, in vivo, os fatores ambientais e genéticos que podem induzir o desenvolvimento da doença e suas complicações secundárias, obtendo assim informações essenciais sobre o seu manejo e tratamento (Lozano et al., 2016). Vários estudos enfocaram o papel de nutrientes específicos, como carboidratos

e gorduras saturadas, no desenvolvimento e transição da DHGNA (Toshimtsu et al, 2007; Tetri et al., 2008). Segundo Tannaz, Puneeta e Maitreyi (2017), a composição de macronutrientes da dieta, o consumo excessivo de carboidratos, açúcares, proteínas, gorduras e a baixa ingestão de fibras podem estar ligados ao risco de desenvolvimento de doenças hepáticas como a DHGNA. Essa patogênese é multifatorial e inclui modificações no metabolismo lipídico, com intenso acúmulo de triglicérides, disfunção mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo. Como consequência do estresse oxidativo, ocorre o crescimento de espécies reativas de oxigênio produzidas pela peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e a diminuição de moléculas antioxidantes como a glutathiona (GSH) (Takaki, Kawai & Yamamoto, 2015).

A DHGNA é a doença hepática crônica mais conhecida no mundo industrializado e será um dos mais importantes desafios de saúde pública nas próximas décadas devido às suas complicações hepáticas e extra-hepáticas (Della et al.). Essa patologia apresenta um espectro de doenças hepáticas que vão desde a esteatose simples até a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que é evidenciada pela presença de inflamação e esteatose hepática, associada à morte de hepatócitos; na qual vários pacientes evoluem para fibrose, cirrose e insuficiência hepática (Dou et al. 2018). A DHGNA é diagnosticada histologicamente quando o acúmulo ocorre em > 5% dos hepatócitos (Tandra, Yeh, Brunt *et al.* 2011; Chalasani et al., 2012)

O reconhecimento da evolução da DHGNA e sua alta prevalência na população mundial são os principais motivos que despertam o interesse dos pesquisadores em realizar estudos relacionados a esta patologia. O maior reconhecimento da doença e esforços adicionais para esclarecer sua patogênese levaram a um crescimento na aplicação de modelos animais de DHGNA nos últimos anos (Lau & Zhang, 2017; Ibrahim, Hirsova, Malhi & Gores, 2016).

No entanto, deve-se notar que o tempo de início e grau de ambas as características metabólicas e DHGNA é dependente de espécies, estirpe, sexo e composição da microbiota intestinal, bem como o teor de gordura na dieta (Herck, Vonghia & Francque, 2017). Apenas estudos que demonstram a utilização do modelo experimental de dieta como indutor de lesão hepática são encontrados na literatura, sem associação com outras comorbidades. Assim, tendo em vista a evidente correlação entre dietas experimentais e indução de patologias, principalmente hepatopatias, o estudo foi direcionado para avaliar parâmetros metabólicos e do tecido hepático em um modelo experimental de dieta hiperlipídica e relacionar este modelo como ferramenta de associação com outras comorbidades.

2. Metodologia

Aspectos éticos

O estudo foi realizado na Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Reis Veloso, Parnaíba, Piauí e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (nº 385/17).

Animais

Nesta pesquisa, foram utilizadas 16 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso de $210,3 \pm 24,4$ g. Os animais foram alojados em uma sala com temperatura controlada, em torno de 20 ± 2 ° C, com ciclo claro / escuro de 12 horas e introdução ad libitum em água e ração.

Design experimental.

Os ratos foram separados aleatoriamente em dois grupos de oito: o grupo de dieta padrão (sem a dieta rica em gordura) e o grupo de dieta rica em gordura (com uma dieta rica em gordura por 20 dias). O grupo da dieta padrão foi alimentado com dieta composta de água e ração ad libitum. Já o grupo da dieta rica em gordura foi alimentado com dieta

composta por 80% de gordura vegetal (Bunge®), 20% de sacarose (União®), água e ração ad libitum. Antes da eutanásia, o peso dos animais foi medido e após o procedimento os fígados foram pesados.

A anestesia foi administrada por injeção intramuscular com solução de 35 mg / kg de cetamina (Francotar-Virbac®) e 15 mg / kg de Xilasina (Rompum-Bayer®) a 2%. Os níveis de glicose capilar foram medidos e amostras de sangue foram retiradas do plexo retro-orbital usando capilares em animais anestesiados, cerca de 2 ml de sangue por animal. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas à velocidade de 4.000 rpm por 10 minutos para posterior separação do soro que foi utilizado para as dosagens bioquímicas. O tecido hepático foi pesado e dividido em duas partes: o menor lobo para bioquímica e o maior lobo para histologia. Após a divisão, os tecidos foram armazenados em formaldeído a 10% e refrigerados a $\pm 5^\circ \text{C}$.

Avaliação histopatológica do fígado

Esse processamento consiste na passagem de cassetes histológicos sucessivos por banho com o seguinte protocolo: desidratação, soluções crescentes de álcool etílico; diafanização, solução de xilol; inclusão, impregnação de parafina; microtomia, cortes histológicos seriados das amostras incluídas na espessura de 5 μm . Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e preparados para 16 animais, os quais foram examinados em microscopia de luz (Nova®).

Na análise histopatológica do fígado, as imagens de campo das lâminas histológicas foram avaliadas para gordura hepática, inflamação e necrose, as quais foram classificadas como esteatose (porcentagem de células hepáticas contendo gordura), seguindo uma escala de 5 graus: 0, ausente ou presente em $<5\%$ dos hepatócitos; grau 1 $\geq 5\%$ e $<25\%$; grau 2, $\geq 25\%$ e $<50\%$; grau 3, $\geq 50\%$ e $<75\%$ e grau 4, $\geq 75\%$. A análise da necrose e inflamação obedeceu à seguinte classificação: 0: nenhuma; 1: <2 focos / campo; 2: 2-4 focos / campo; 3: > 4 focos / campo (Kleiner, Brunt, Van Natta et al., 2005).

Níveis de MDA

Os níveis de MDA do tecido hepático foram avaliados de acordo com o método descrito por Mihara e Uchiyama (Uchiyama e Mihara, 1978). Amostras de tecido hepático em torno de 90 a 160 mg foram homogeneizadas em KCL 1,15% resfriado, resultando em solução ácida com concentração de 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e adicionou-se 1,0 ml da solução aquosa de TBA a 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H₃PO₄ a 1%). Esta mistura foi agitada e aquecida durante 50 minutos num banho de água fervente. A preparação foi resfriada instantaneamente em um banho de água gelada, seguido pela adição de 3,5 ml de n-butanol. A camada de butanol foi reservada por centrifugação a 1.200 g durante 9 minutos. A concentração de TBARS foi calculada pela diferença entre os valores obtidos em cada leitura, resultante do comprimento de onda, por meio de regressão linear a partir de uma curva padrão.

Atividade MPO

Aqui, medimos a atividade da mieloperoxidase para avaliar o acúmulo de neutrófilos no fígado (Chaves, Nicolau, Silva et al., 2013). Foram pesados 40 mg de tecido, posteriormente macerados e homogeneizados em tampão de potássio 50 mg / ml com brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB). A solução foi centrifugada a 4.000 rpm por 6 minutos a 4 $^\circ\text{C}$. Por fim, o sobrenadante foi transferido para uma placa de ELISA para a posterior leitura da absorbância de 450 nm demonstrando a atividade enzimática com o uso do dicloridrato de O-dionisidina na reação com peróxido de hidrogênio 1% (Chaves, Nicolau, Silva et al., 2013).

Níveis de GSH

50 a 100 mg das amostras de fígado foram homogeneizadas em 5 ml de EDTA 0,02 M gelado. Em seguida, retirou-se 4,0 ml deste homogeneizado, que foi misturado com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético a 50%. Durante 15 minutos, o composto foi agitado e centrifugado a 3.000 g. Foram retirados 2,0 ml do sobrenadante, aos quais foram adicionados 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M. Pouco depois, as amostras preparadas foram agitadas e misturadas para homogeneização. Ao final, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (Sedlak e Lindsay, 1968). Os dados foram apresentados como $\mu\text{g} / \text{g}$ de tecido.

Análise estatística

Os dados são expressos como média e / ou desvio padrão da mediana. A distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As distinções entre os dois grupos foram analisadas usando testes U de Mann-Whitney para dados não paramétricos e testes t de Student não pareados para dados paramétricos.

3. Resultados e Discussão

Peso corporal e hepático em animais

O peso do grupo de dieta rica em gordura é maior ($210,4 \pm 8,63$) em comparação com o grupo de dieta padrão ($207,1 \pm 3,44$), mas não foi relatada diferença significativa ($p > 0,05$). A comparação entre os dois grupos em relação ao peso do fígado não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e peso hepático.

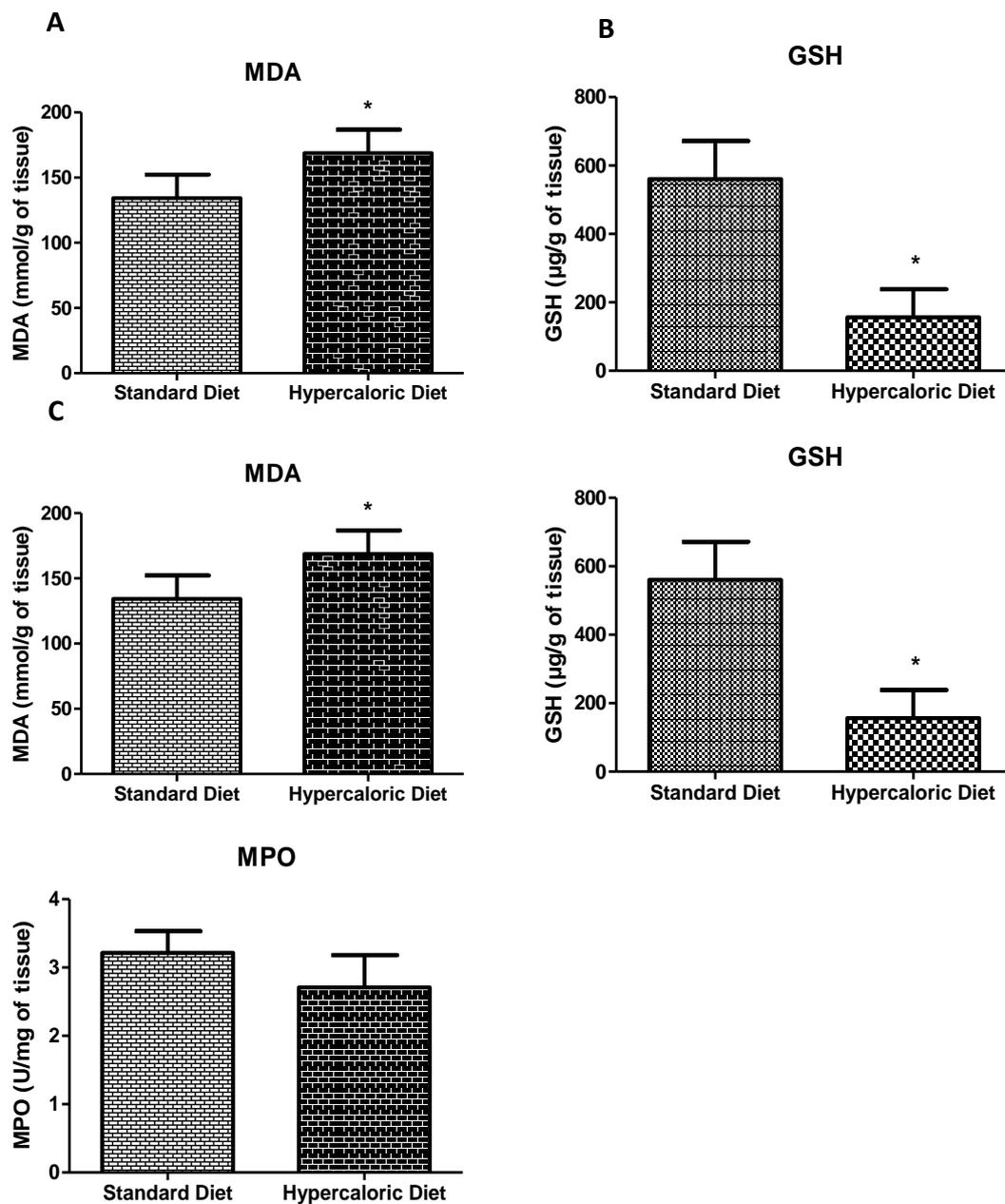
Grupo	Peso do corpo	Peso do fígado
Dieta padrão	207.1 ± 3.43	7.13 ± 0.19
Dieta rica em gordura	210.4 ± 8.63	7.31 ± 0.34

Fonte: Autores.

Níveis de GSH e MDA no tecido hepático

Diferença significativa foi relatada no grupo de dieta rica em gordura ($560,0 \pm 111,4 \mu\text{g} / \text{g}$ de tecido) (Figura 1). Na comparação entre a dieta alimentar e a rica em gorduras, os níveis de MDA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). O grupo de dieta rica em gordura apresentou aumento da peroxidação lipídica quando comparado ao grupo de dieta padrão (dieta padrão com $120,2 \pm 12,86 \text{ mmol} / \text{g}$ de tecido e dieta rica em gordura com $175,4 \pm 19,24 \text{ mmol} / \text{g}$ de tecido) (Figura 1).

Figura 1. A) Níveis de malondialdeído no tecido hepático. B) Níveis de glutaciona no tecido hepático. C) Níveis de MPO no tecido hepático. * Diferença significativa ($P < 0,05$).



Fonte: Autores.

Níveis de MPO no tecido hepático

Nenhuma diferença significativa foi relacionada entre os grupos de estudo em relação aos níveis de MPO no tecido hepático ($3,21 \pm 0,31$ U / mg de tecido, $2,8 \pm 0,6$ U / mg de tecido, grupos de dieta padrão e dieta rica em gordura, respectivamente ($p > 0,05$) (Figura 1).

Concentrações bioquímicas séricas de animais

As medidas bioquímicas de ALT, albumina, colesterol total, ácido úrico, cálcio e HDL mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo de dieta padrão e o grupo de dieta rica em gordura. Houve aumento no grupo de dieta hiperlipídica com ALT, ácido úrico, albumina, colesterol, cálcio e diminuição de AST e HDL em comparação ao grupo de dieta padrão (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações bioquímicas no soro dos animais.

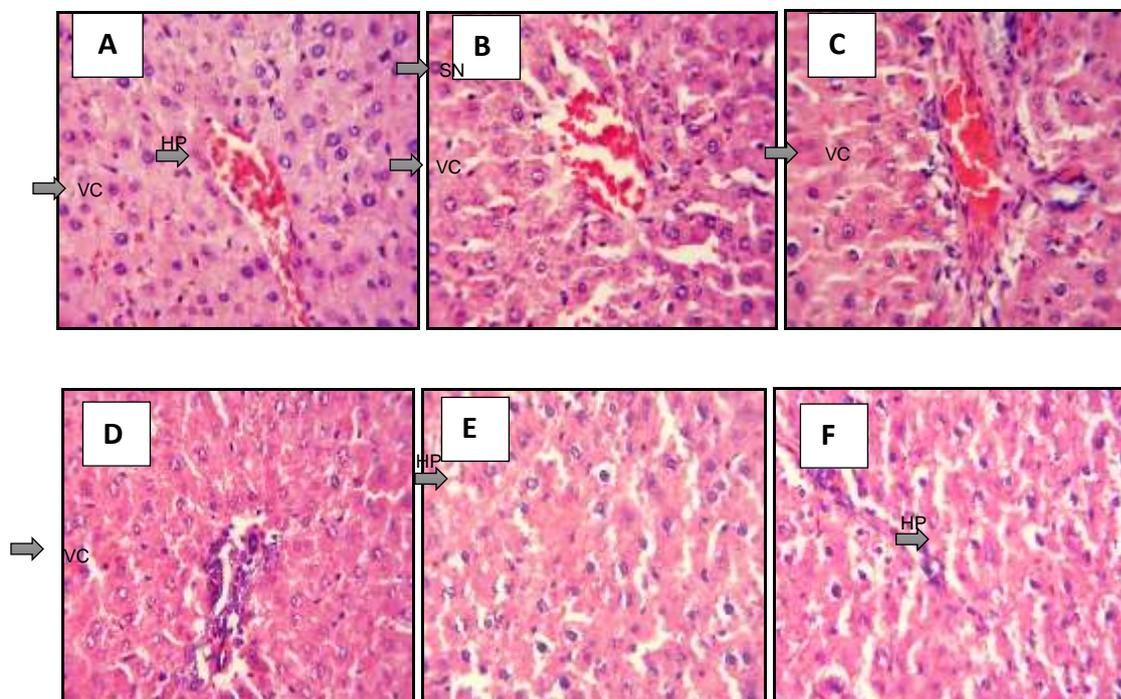
Markers	Standard Diet	Hypercaloric Diet
ALT	32.63 ± 2.65	49.43 ± 2.66*
AST	82.39 ± 18.23	67.55 ± 6.77
ALB	3.38 ± 0.09	4.05 ± 0.28*
CT	87.50 ± 8.21	106.9 ± 11.99*
AU	0.81 ± 0.18	4.76 ± 1.45*
UREIA	40.01 ± 2.19	34.46 ± 1.88
FAL	83.0 ± 7.20	102.3 ± 9.61
HDL	24.67 ± 0.83	23.88 ± 1.92*
CA	10.13 ± 0.16	12.56 ± 0.63*

* Dosagens bioquímicas com diferença significativa ($P < 0,05$). ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, ALB: albumina, CT: colesterol total, AU: ácido úrico, FAL: fosfatase alcalina, HDL: lipoproteína de alta densidade, CA: cálcio. Fonte: Autores.

Avaliação histopatológica do fígado

As Figuras 2A, 2B e 2C mostram o tecido hepático do grupo de dieta padrão, no qual os hepatócitos apresentam formato normal. No grupo de dieta rica em gordura (Figuras 2D, 2E e 2F), foi observado o início de esteatose e inflamação. A análise dos escores de esteatose dos tecidos hepáticos de ambos os grupos mostrou baixos valores de inflamação e esteatose (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 2: A), B) e C) grupo de dieta padrão, apresentando veia central e hepatócitos com conformação normal. D), E) e F) Grupo dieta hipercalórica, apresentando esteatose microvesicular. As setas indicam veia central (VC), sinusóides (SN) e hepatócitos (HP). Cor: Hematoxilina-Eosina (HE), ampliação original X40.



Fonte: Autores.

Tabela 3. Avaliação histopatológica do fígado.

Grupo	Dieta padrão	Dieta rica em gordura
Escore de esteatose	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)
Escore de inflamação	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)
Escore necrose	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)

Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0.05$). Fonte: Autores.

DRG é bem conhecida por induzir alguns distúrbios metabólicos, e as consequências são completamente dependentes de sua composição e duração (Buettner et al., 2006, Ghibaudi et al., 2002). Uma dieta rica em gordura, normalmente consistindo de 30 a 60% de gordura, é comumente usada experimentalmente para induzir DHGNA em roedores. No entanto, a quantidade de gordura, composição e duração da dieta podem causar diferentes respostas em relação à obesidade, intolerância à glicose, dislipidemia, aumento da lipogênese, produção de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, dependendo da espécie, linhagem e gênero (Takahashi, Soejima, Fukusato, 2012; Kanuri, Bergheim, 2013). Neste estudo, observou-se que 20 dias de oferta de dieta hiperlipídica, em modelo experimental, foi capaz de gerar alterações metabólicas semelhantes à DHGNA, porém este modelo não foi capaz de provocar alterações teciduais suficientes que se caracterizasse nos escores histopatológicos hepáticos.

Mcdonald SD. et al (2011) relatam que o uso de um DRG em estudos de curto prazo, como tem sido comumente feito em animais, não reflete adequadamente os padrões alimentares, com consequentes distúrbios metabólicos. Os cortes hepáticos avaliados histologicamente mostram uma pontuação baixa, com início de acúmulo de gordura e inflamação nos hepatócitos da maioria dos animais (Figura 2D, 2E e 2F). Esse resultado demonstra que o período não foi suficiente para a instalação da lesão hepática, uma vez que a principal característica histológica da DHGNA, como o nome indica, é o acúmulo de gordura na forma de triglicerídeos dentro dos hepatócitos, lesão originalmente chamada de "esteatose". A presença de > 5% de hepatócitos esteatóticos em uma seção do tecido hepático é aceita como o critério mínimo para o diagnóstico histológico de DHGNA (Brunt e Tiniakos, 2009).

No modelo de dieta atual, houve uma redução significativa em GSH no grupo de dieta rica em gordura quando comparado ao grupo de dieta padrão. A depleção de GSH tem sido considerada como um papel causal na disfunção celular ligada ao estresse oxidativo / morte celular (Dou et al. 2018). O estresse oxidativo é considerado de fundamental importância na progressão da doença, desde simples esteatose até esteatohepatite e lesão hepática (Takaki, Kawai e Yamamoto, 2015).

O conteúdo do MDA reflete o dano da peroxidação lipídica do tecido e indiretamente reflete a gravidade do ataque dos radicais livres (Khan et al., 2015; Wu, Li, Wen e Li, 2007). O MDA é o principal produto da degradação da peroxidação lipídica, que pode atuar com proteínas e enzimas de membrana, aumentar a permeabilidade da membrana, alterar a estrutura, função e metabolismo das membranas celulares e causar danos ao organismo. Os resultados evidenciaram um aumento significativo na peroxidação lipídica hepática, evidenciado pela elevação dos níveis de MDA no grupo de dieta rica em gordura em comparação com o grupo de dieta padrão. Este é um achado relevante, uma vez que vários estudos clínicos mostraram que níveis elevados de produtos do estresse oxidativo da peroxidação lipídica circulante (Poliment et al., 2015), bem como níveis reduzidos de antioxidantes, estão presentes na DHGNA (Yesilova et al., 2005).

Estudos anteriores relataram atividade de MPO significativamente maior no tecido hepático na presença de DHGNA, indicando aumento da gravidade da inflamação (Kulkarni et al., 2014). A mudança nas atividades dessas enzimas pode ser usada como um indicador de estresse oxidativo dentro das células hepáticas (Ly et al., 2017). Em nosso estudo, a atividade da MPO não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados. A ausência de diferenças entre os grupos quanto à inflamação evidenciada no escore histopatológico pode explicar os dados de atividade da MPO no fígado.

As aminotransferases séricas, especialmente ALT, tornaram-se o biomarcador padrão para a detecção de lesão hepática (Thulin et al., 2008). Os dados da análise bioquímica mostraram um aumento nos níveis de ALT e uma diminuição nos níveis de AST do grupo de dieta rica em gordura em comparação com o grupo de dieta padrão, o que mostra uma associação com a progressão da doença, uma vez que está de acordo com estudos anteriores nesse AST e as atividades séricas de ALT são marcadores bioquímicos bem documentados para a presença de DHGNA (Yulong et al., 2018). Níveis de ALT acima do limite superior normal e níveis de AST abaixo de ALT são achados típicos que apóiam a presença de DHGNA (Sattar, Forrest e Preiss, 2014).

Está bem estabelecido que a DHGNA está intimamente associada a anormalidades lipídicas (Keefe, 2001). No estudo, os níveis de colesterol total apresentaram diferença significativa entre os grupos, apresentando níveis mais elevados no grupo de dieta rica em gordura. Evidências recentes sugerem que o colesterol dietético é um fator crítico no desenvolvimento de DHGNA experimental em modelos animais e que o metabolismo do colesterol é significativamente alterado, refletido pela diminuição da absorção e aumento da síntese do colesterol (Neuman, Cohen e Nanau, 2014). Nossos resultados estão de acordo com esses dados.

Sabe-se que a dislipidemia em pacientes com DHGNA está relacionada à diminuição dos níveis de HDL (Krishan, 2016). Este estudo mostrou que houve diminuição do HDL no grupo de dieta hiperlipídica em relação ao grupo de dieta padrão, apresentando diferença significativa entre os grupos.

A deposição de lipídios no fígado leva à disfunção do fígado. O conteúdo reduzido de albumina observado em um estudo com camundongos com DHGNA correlacionou-se diretamente com a deposição de lipídios no fígado. A albumina é a proteína sérica circulante mais abundante. O conteúdo de albumina sérica tem sido usado como um teste para a função hepática. A síntese de albumina é uma função característica das células saudáveis do fígado (Noureddin e Rohit, 2012). Na comparação entre os grupos de estudo, não foram encontradas diferenças significativas. A ausência de esteatose evidenciada no escore histopatológico pode explicar a análise bioquímica da albumina.

Altas concentrações de ácido úrico induzem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias de hepatócitos, provavelmente levando a lesões mitocondriais, sendo o ácido úrico um fator de risco para DHGNA (Thulin et al., 2008). No estudo, os níveis de ácido úrico apresentaram aumento no grupo de dieta rica em gordura, apresentando diferença significativa entre os grupos. Esse achado corrobora outros estudos que relatam que níveis elevados de AU podem aumentar o risco de desenvolver DHGNA em aproximadamente duas vezes (Hu, Xiao-Yu et al., 2018)

O fígado é a fonte de muitas proteínas e é o regulador de várias vias que envolvem o metabolismo ósseo. Evidências de crescimento sugerem baixa desmineralização óssea em pacientes com DHGNA (Eshraghian, 2017). Os resultados mostraram que houve aumento dos níveis de CA no grupo de dieta rica em gordura em relação ao grupo de dieta padrão, apresentando diferença significativa entre os grupos. Vários estudos têm mostrado que indivíduos com marcadores inflamatórios elevados apresentam menor desmineralização óssea na DHGNA (Hotamisligil, 2006). A ausência de inflamação apresentada no escore histopatológico pode explicar os dados da CA.

Este estudo permitiu observar que o modelo de dieta rica em gordura não induziu DHGNA, enfatizando o modelo de dieta rica em gordura como um instrumento que pode ser usado para testar outras comorbidades.

4. Conclusão

Este estudo demonstrou que o modelo de dieta rica em gordura não causou DHGNA. Esse achado permite utilizar a dieta hiperlipídica, descrita neste estudo, para investigar possíveis alterações hepáticas causadas por outras comorbidades.

Referências

- Brunt, E. M. & Tiniakos, D. G. (2009). Fatty Liver Disease. In Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas (1087-1114). *Elsevier Inc.* <https://doi.org/10.1016/B978-141604059-0.50044-8>.
- Buettner, R. et al. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*; 6(3), 485– 501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>.
- Chalasan, N. et al. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, (55). <https://doi.org/10.1002/hep.25762>.
- Chaves, L. S., Nicolau, L. A. & Silva, R. O. et al. (2013). Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red alga *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 35, 93-100. <https://doi.org/10.3109/08923973.2012.707211>.
- Della, P. G. et al. (2017). Isocaloric Dietary Changes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Cardiometabolic Risk Individuals. *Nutrients*, 26(9), 1065- 10. <https://doi.org/10.3390/nu9101065>.
- Dou et al. (2018). Glutathione disulfide sensitizes hepatocytes to TNF α -mediated cytotoxicity via IKK- β S-glutathionylation: a potential mechanism underlying non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(7). <https://doi.org/10.1038/s12276-017-0013-x>.
- Eshraghian, A. (2017). Bone metabolism in non-alcoholic fatty liver disease: vitamin d status and bone mineral density. *Minerva endocrinológica*, June;42(2), 164-72. <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.16.02587-6>.

- Ghibaoui, L. et al. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res.*, 10, 956–963. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>.
- Herck, V. M., Vonghia, L. & Francque, S. M. (2017) Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease - A Starter's Guide. *Nutrients*, 9(10), 1072. <https://doi.org/10.1038/oby.2002.130>.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444:860-7. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
- Hu, Xiao-Yu et al. (2018). Risk Factors and Biomarkers of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Observational Cross-Sectional Population Survey. *BMJ Open*, 12. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-019974>.
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H. & Gores, G.J. (2016) Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, delete, and inflame. *Dig. Dis. Sci.*, 61, 1325–1336. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>.
- Kanuri, G. & Bergheim, I. (2013). In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci.* 14:11963–80. <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>.
- Keefe, E. B. (2001). Liver transplantation: current status and novel approaches to liver. *Gastroenterology*, 120(3), 749-62. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22583>.
- Khan, et al. (2015). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hyperglycemia in rat: A novel study, *Toxicol. Ind. Health*, 31, 546–553. <https://doi.org/10.1177/0748233713475503>.
- Krishan, S. (2016). Correlation between non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and dyslipidemia in type 2 diabetes. *Diab Met Syndr: Clin Res Ver*, 10, 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.01.034>.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M. & Van Natta, M. et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*; 41, 1313-21. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
- Kulkarni, N. M et al. (2014). A novel animal model of metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease and skin inflammation. *Pharmaceutical Biology*, 53(8), 1110–1117. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.960944>.
- Lau, J. K. C. & Zhang, X. Y. U. J. (2017). Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*, 241(1), 36-44. <https://doi.org/10.1002/path.4829>.
- Lozano, et al. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition & Metabolism*, 13(15). <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0074-1>.
- Ly, F. et al. (2017). Deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis via regulation of hepatic oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 486, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.023>.
- Mcdonald, S. D. et al. (2011). “Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight”. *Nutrition Research*, 31, 707–71. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.08.009>.
- Mikolasevic, I. et al. (2014). Nonalcoholic fatty liver disease: a new factor that interplays between inflammation, malnutrition, and atherosclerosis in elderly hemodialysis patients. *Clin. Interv. Aging*. 9, 1295–1303. <https://doi.org/10.2147/CIA.S65382>.
- Neuman, M. G.; Cohen, L. B. & Nanau, R. M. (2014). Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 28(11), 607-618.
- Noureddin, M. D. & Rohit, L. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: indications for liver biopsy and noninvasive biomarkers mazen. *Clin. Liver Dis.*, 1, 25–38. <https://doi.org/10.1002/cld.65>.
- Polimeni, L, et al. (2015). Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World J Hepatol.*, 7(10), 1325–36. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i10.1325>.
- Sattar, N., Forrest, E. & Preiss, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ*, 349, 4596. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4596>.
- Sedlak, J. & Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 24, 192–205.
- Takahashi, Y., Soejima, Y. & Fukusato, T. (2012) Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 18:2300–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i19.2300>.
- Takaki, A.; Kawai, D. & Yamamoto, K. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 20704–20728. <https://doi.org/10.3390/ijms141020704>.
- Tandra, S.; Yeh, M. M. & Brunt, E. M. et al. (2011). Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.*, 55, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>.
- Tannaz, E., Puneeta, T. & Maitreyi R. (2017). Dietary Composition Independent of Weight Loss in the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*, 9, 800. <https://doi.org/10.3390/nu9080800>.
- Tetri L. H. et al. (2008). Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295, G987-G995. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90272.2008>.

- Toshimitsu, K. et al. (2007). Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition*, 23, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.004>.
- Thulin, P. et al. (2008). PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 231, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.03.007>.
- Uchiyama, M., & Mihara M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86, 271-278. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1).
- Wu, L., Li, T. & Wen, Y.Q. Li. (2007). Protective effects of echinacoside on carbontetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Toxicol.*, 232, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.12.013>.
- Yesolova Z. et al. (2005). Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(4), 850-5. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.41500.x>.
- Yulong, W. U. et al. (2018). Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate highfat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation. *Biomac*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.140>.