



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Iara Karise dos Santos Mendes

**Perda e/ou ganho de massa corporal afeta estresse oxidativo e
esteatose hepática em camundongos**

Rio de Janeiro

2014

Iara Karise dos Santos Mendes

**Perda e/ou ganho de massa corporal afeta estresse oxidativo e esteatose
hepática em camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini

Coorientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M538 Mendes, Iara Karise dos Santos.
Perda e/ou ganho de massa corporal afeta estresse oxidativo e esteatose hepática em camundongos / Iara Karise dos Santos Mendes. – 2014.
80f.

Orientadora: Tatiana Marlowe Cunha Brunini.

Coorientadora: Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Esteatose hepática - Teses. 3. Stress oxidativo - Teses. 4. Emagrecimento - Teses. 5. Dieta hiperlipídica. I. Brunini, Tatiana Marlowe Cunha. II. Águila, Márcia Barbosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Iara Karise dos Santos Mendes

**Perda e/ou ganho de massa corporal afeta estresse oxidativo e esteatose
hepática em camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de setembro de 2014.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Tatiana Marlowe Cunha Brunini
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda (Coorientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Lucia Gomes Rodrigues
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Gorete e Francisco Mendes por se absterem de muitas coisas para que eu pudesse chegar aqui. Todo o meu amor e gratidão por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

Antônio Mendes Lopes (*in memoriam*), obrigada pelo privilégio em poder ter sido sua “sobrinha favorita”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo e por estar presente em todos os momentos da minha vida. Por permitir que eu e os que amo, acordassem com saúde todos os dias.

Aos meus pais, de vocês recebi o dom da vida. Vocês emprestaram-me seu amor para que eu pudesse existir, mais que isso, trabalharam, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus. Por tudo sou infinitamente grata.

Ao meu namorado Francisco Carvalho que soube suportar meus piores momentos, acalmar meus piores medos e me fazer sossegar quando a tensão parecia insuportável. Agradeço pela compreensão, incentivo, amor, apoio e carinho dedicados. Sem você eu não teria chegado até aqui. Te amo.

A minha Manuela pelo simples fato dela existir. Nem todos os anjos possuem asas...

A minha orientadora/ chefe/ mãe/ amiga Tatiana Brunini. Excelente profissional, íntegra e dedicada, o meu reconhecimento e gratidão pelas horas que, incansavelmente, voltou-se ao meu trabalho e me deu a mão quando algumas vezes fraquejei. Obrigada pela orientação, por me ajudar e estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigada por nunca desistir de mim! Seu apoio e sua certeza do meu sucesso foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Sempre recordarei das valiosas lições ensinadas.

A Prof.^a Márcia Águila, de quem tenho muito orgulho de ser aluna, por me acolher em seu laboratório e permitir que eu desfrutasse dos seus conhecimentos inigualáveis. Obrigada por todas as oportunidades, por entender meus erros, aceitar minhas limitações e me incentivar a melhorar sempre.

Ao Prof. Antonio Cláudio pela oportunidade de aprendizado e por me acolher desde a graduação.

Ao Prof. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda que me deu todo o suporte técnico para que eu pudesse desenvolver meu trabalho. Obrigada por tudo. Serei eternamente grata.

A Prof.^a Cristiane Matsuura pelo auxílio em todos os momentos. Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir, a pegar na minha mão e me conduzir sempre que me senti perdida. Meus sinceros agradecimentos. Você me inspira a ser uma profissional melhor me mostrando que com dedicação e esforço é possível se

chegar a qualquer lugar. Obrigada principalmente por suportar meu leve mau humor na reta final. Rs!

A Marcela Anjos Martins meu eterno obrigada. Profissional e amiga em quem me espelho. Te admiro pela corretíssima profissional que és. Pela capacidade de aguentar com bom humor todas as adversidades da vida, as quais eu sei que não são poucas. Se um dia eu for metade do que você é, já serei feliz. Um exemplo de pessoa que sempre esteve ao meu lado e sem a qual com certeza este trabalho não existiria.

Aos meus amigos do Laboratório de Transporte de Membrana pelo auxílio em todos os momentos, pela amizade, além de tornarem o ambiente de trabalho sempre muito divertido. Obrigada por entenderem a minha forma de trabalho e desculpem-me se em algum momento não fui correta com vocês, mas podem ter certeza que sempre serei leal a vocês. Este trabalho é de todos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de morfometria, metabolismo e doenças cardiovasculares, meu muitíssimo obrigada pela ajuda, aprendizado e principalmente por me receberem sempre com muito carinho. Cada um teve um papel muito importante neste trabalho e eu não tenho palavras pra descrever o quanto eu aprendi e aprendo com todos vocês.

Wandinha a você todo o meu amor e carinho. Uma das melhores amigas que alguém poderia querer. Obrigada por todos os momentos que passei ao seu lado desde a graduação, seja no Brasil ou na Europa. Você é a pessoa mais doce que existe no mundo e creio que todo esse açúcar seja o motivo de você ser ligada no 220V. Rs! Obrigada pela bondade infinita que existe em seu coração, por ser amiga e companheira nas horas difíceis. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Minha eterna gratidão à minha eterna amiga.

Aline Penna minha boneca, um obrigada imensurável a você. Como eu sempre digo: você é um doce na minha vida! Sortudas são as pessoas que podem conviver com você. Aprendo sempre contigo. Meus eternos e sinceros agradecimentos.

Obrigada à pessoa mais crítica do mundo, mas que com certeza é uma das que possui o maior coração. Sei que neste peito bate um coração generoso, divertido e sempre disposto a ajudar. Marcel, obrigada por caminhar comigo nessa jornada de conhecimento deste fantástico mundo da pesquisa. Rs! Obrigada por me ouvir e me socorrer nas inúmeras vezes em que precisei.

Nathalia Pinto, Luciana Melquiades, Camila Scavone e Andrea Marques, obrigada por tudo o que já vivemos e pela amizade verdadeira que a muito conquistamos e que levamos conosco até hoje. Vocês são muito importantes na minha vida e com certeza não seria metade da pessoa que sou se não fossem vocês. Sempre estiveram presentes e sempre me ajudaram, creio que sempre estarão, e sei que posso contar com vocês sempre que necessário.

A todos os meus outros amigos que souberam compreender e abriram mão dos momentos de convivência e pelo vazio deixado quando vocês muito precisaram, meu carinho e agradecimento cheio de reconhecimento pelos sacrifícios. Obrigada.

A todos os professores que tive durante esta longa jornada desde a graduação e durante todo o mestrado, sem exceções, vocês de alguma forma contribuíram para que eu me tornasse o que sou hoje. Obrigada por saciarem a minha sede de saber.

A todos os funcionários da UERJ, desde os ascensoristas aos técnicos de limpeza e seguranças. Obrigada por facilitarem meu trabalho.

Aos professores integrantes da banca examinadora, por aceitarem o convite e colaborarem com este trabalho.

A CAPES, FAPERJ e ao CNPq, pelo suporte financeiro deste trabalho.

A todos que esqueci-me de citar mas que direta ou indiretamente, presentes ou ausentes contribuíram para que eu chegasse a me tornar o que me torno exatamente hoje: Mestre em Biologia Humana e Experimental. Esta pesquisa é resultado do trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de pessoas como vocês. Muito obrigada! Com forte emoção lhes deixo meus profundos e sinceros agradecimentos.

Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.

Guimarães Rosa

RESUMO

MENDES, Iara Karise dos Santos. *Perda e/ou ganho de massa corporal afeta estresse oxidativo e esteatose hepática em camundongos*. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A doença gordurosa hepática não alcoólica (DGHNA) está emergindo como a doença mais comum no mundo ocidental, devido à sua associação com a obesidade. A obesidade é um problema de saúde pública que atinge indivíduos de todas as classes sociais e em todas as faixas etárias. Não se conhece exatamente através de qual mecanismo, mas sabe-se que o estresse oxidativo (EO) possui forte ligação com o desenvolvimento e progressão da DGHNA. Uma dieta hiperlipídica e consequente obesidade podem prejudicar as vias de sinalização celular e estimular a produção de radicais livres (RL) com consequentes alterações no metabolismo. A via de sinalização celular e modificações metabólicas relacionadas à obesidade estão bem descritas na literatura, no entanto a correlação entre esses fatores e os marcadores de EO no tecido hepático associados à flutuações de peso necessitam de mais investigações. O objetivo deste estudo foi investigar o impacto da perda e do ganho de massa corporal em marcadores de EO no fígado de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (HF) e sua associação com a presença de esteatose hepática, testes de função hepática, adiposidade e perfis lipídicos e glicêmicos. Camundongos machos C57BL/6 com três meses de idade foram divididos em quatro grupos (n = 10, cada): grupo alimentado com dieta padrão (grupo SC, 10% do total de energia a partir de gordura) durante 16 semanas, grupo alimentado com alto teor de gordura (grupo HF, 50% do total de energia a partir de gordura) durante 16 semanas. Uma parte do grupo SC trocou para a dieta HF (grupo SC-HF) e por fim uma parte do grupo HF trocou para a dieta SC (grupo HF-SC). Nos grupos SC-HF e HF-SC, cada período de dieta durou 8 semanas. Como resultado tem-se que os animais dos grupos SC-HF e HF apresentaram diminuição dos níveis de RNAm e da expressão proteica de enzimas antioxidantes no fígado. A presença de elevados níveis de ALT no grupo HF pode ser indicativo de lesão hepática, resultado revertido no grupo HF-SC que apresentou valores similares aos do grupo SC. Observou-se também no grupo HF aumento da adiposidade intra-abdominal e subcutânea, intolerância à glicose e hipercolesterolemia em comparação com os animais do grupo SC. Nossos resultados demonstram que a perda de massa corporal induzida unicamente pela troca de dieta é uma estratégia importante para reduzir a esteatose hepática e melhorar a expressão proteica e gênica das enzimas antioxidantes melhorando também os efeitos metabólicos adversos oriundos da obesidade. Parte deste benefício pode ser conferida por uma redução do estresse oxidativo hepático.

Palavras-chave: Obesidade. Esteatose hepática. Estresse oxidativo. Perda de massa corporal. Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

MENDES, Iara Karise dos Santos. *Loss and/or gain body weight affects oxidative stress and steatosis hepatic in mice*. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is emerging as the most common chronic liver condition in the Western world, due to its association with obesity. The objective of this study was to investigate the impact of changes in body mass on oxidative stress markers in livers of mice fed a high-fat (HF) diet and their association with liver function tests and structure, adiposity, glucose and lipid profile. Three-month-old male C57BL/6 mice were divided into four groups (n = 10, each): standard chow (SC, 10% of total energy from fat) during 16 weeks, high-fat diet (HF, 50% of total energy from fat) during 16 weeks, one group who changed the SC to the HF diet (SC-HF), and another group who changed the HF to the SC diet (HF-SC). In SC-HF and HF-SC groups, each diet period lasted for 8 weeks. The HF diet during 8 (SC-HF) and 16 weeks (HF) repressed mRNA levels and protein expression of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) in the liver. These groups also showed liver steatosis, affected liver function markers, and increased intra-abdominal and subcutaneous adiposity, and induced glucose intolerance and hypercholesterolemia compared to SC group, which could be reversed by body mass loss due to dietary intervention (HF-SC). Our findings demonstrate that diet-induced body mass loss is an important strategy to reduce intra-hepatic lipid accumulation and to improve its adverse metabolic effects, and part of this benefit may be conferred by a reduced hepatic oxidative stress.

Keywords: Obesity. Fatty liver. High fat diet. Oxidative stress. Body mass loss.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Redução tetravalente do O ₂ com formação das espécies reativas de O ₂ ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila	22
Figura 2 –	Integração dos sistemas de defesa enzimático	25
Figura 3 –	Esquema do desenho experimental utilizado no estudo ...	32
Figura 4 –	Esteatose hepática quantificada através da contagem de pontos	37
Figura 5 –	Evolução da massa corporal dos quatro grupos estudados ao longo do período experimental	45
Figura 6 –	Níveis proteicos de superóxido dismutase no tecido hepático	48
Figura 7 –	Expressão gênica da enzima superóxido dismutase no tecido hepático	49
Figura 8 –	Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido hepático	50
Figura 9 –	Níveis proteicos de catalase no tecido hepático	51
Figura 10 –	Expressão gênica da enzima catalase no tecido hepático	52
Figura 11 –	Atividade da enzima catalase no tecido hepático	53
Figura 12 –	Níveis proteicos de glutaciona peroxidase no tecido hepático	54
Figura 13 –	Expressão gênica da enzima glutaciona peroxidase no tecido hepático	55
Figura 14 –	Atividade da enzima glutaciona peroxidase no tecido hepático	56
Figura 15 –	Níveis proteicos de glutaciona redutase no tecido hepático	57
Figura 16 –	Expressão gênica da enzima glutaciona redutase no tecido hepático	58
Figura 17 –	Análise de esteatose hepática dos animais experimentais	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas utilizadas no experimento	33
Tabela 2 –	Sequência dos <i>primers</i> utilizados no experimento	40
Tabela 3 –	Perfil lipídico e glicídico nos diferentes grupos experimentais	46
Tabela 4 –	Provas de função hepática nos diferentes grupos experimentais	47
Tabela 5 –	Índice de adiposidade dos animais ao fim do período experimental	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AGP	Ácidos graxos poli-insaturados
ALT	Alanine aminotransferase
CAT	Catalase
DGHNA	Doença gordurosa hepática não alcoólica
DM	Diabetes mellitus
EO	Estresse oxidativo
EPM	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial de Saúde
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
RI	Resistencia insulínica
RL	Radicais livres
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Obesidade	17
1.2	Modelo animal	19
2	ESTRESSE OXIDATIVO	21
2.1	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	21
2.2	Peroxidação lipídica	22
2.3	Oxidação de proteínas	23
2.4	Sistema de defesa antioxidante	24
2.5	Doença gordurosa hepática não alcoólica	25
3	DIETA NO TRATAMENTO DA OBESIDADE	28
4	OBJETIVO	30
4.1	Objetivo geral	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	Desenho experimental	31
5.2	Dietas experimentais	32
5.3	Massa corporal, ingestão alimentar	34
5.4	Teste oral de tolerância à glicose	34
5.5	Eutanásia	34
5.6	Análise do perfil lipídico	35
5.7	Análise da função hepática	35
5.8	Análise do tecido hepático	35
5.9	Dosagem de proteínas	37
5.10	Western blotting	37
5.11	RT- PCR em tempo real	38
5.12	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)	39
5.13	Carbonilação de proteínas	40
5.14	Atividade das enzimas antioxidantes	41
5.14.1	<u>Medida da Superóxido Dismutase</u>	41
5.14.2	<u>Medida da Catalase</u>	42

5.14.3	<u>Medida da Glutathione Peroxidase</u>	42
5.15	Análise estatística	43
6	RESULTADOS	44
6.1	Ingestão alimentar	44
6.2	Massa corporal	44
6.3	Perfil lipídico	45
6.4	Tolerância à glicose	46
6.5	Avaliação das provas de função hepática	46
6.6	Índice de adiposidade	47
7	ENZIMAS ANTIOXIDANTES	48
7.1	Superóxido dismutase (SOD)	48
7.1.1	<u>Western Blotting</u>	48
7.1.2	<u>RT-PCR em tempo real</u>	49
7.1.3	<u>Atividade enzimática</u>	49
7.2	Catalase	50
7.2.1	<u>Western Blotting</u>	50
7.2.2	<u>RT-PCR em tempo real</u>	51
7.2.3	<u>Atividade enzimática</u>	52
7.3	Glutathione peroxidase (GPX)	53
7.3.1	<u>Western Blotting</u>	53
7.3.2	<u>RT-PCR em tempo real</u>	54
7.3.3	<u>Atividade enzimática</u>	55
7.4	Glutathione redutase	56
7.4.1	<u>Western Blotting</u>	56
7.4.2	<u>RT-PCR em tempo real</u>	57
8	ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO NO TECIDO HEPÁTICO	59
9	DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA NÃO ALCÓOLICA	60
10	DISCUSSAO	61
	CONCLUSAO	67
	REFERENCIAS	68
	ANEXO A - Comitê de Ética	79
	ANEXO B - Submissão do artigo	80

INTRODUÇÃO

O excesso de gordura corporal é um dos fatores de risco mais importantes para doenças crônicas não transmissíveis em todo o mundo (Holt, 2003). A obesidade é um problema de saúde pública que atinge indivíduos de todas as classes sociais e em todas as faixas etárias. Está relacionada a fatores metabólicos, genéticos, sedentarismo, hábitos alimentares, condições socioeconômicas e comportamentais (Nelson et al., 2007). Para evitar que a prevalência da obesidade continue crescendo, surge a necessidade de adotarem-se medidas de prevenção (Lee et al., 2014).

Dietas muito restritas em energia podem levar à fome e à insatisfação, fazendo assim com que o indivíduo as abandone e acabe por retornar a alimentação desbalanceada, com concomitante ganho de peso. O "efeito sanfona", que ocorre em indivíduos que entram e saem de dietas muito restritivas, acaba por causar desequilíbrio no organismo e podem levar a ganho ponderal significativo, o que gera ganho de peso ainda maior do que o inicial (Barbosa-da-Silva et al., 2012).

A doença gordurosa hepática não alcoólica (DGHNA) é caracterizada por achados histopatológicos compatíveis com doença hepática alcoólica em indivíduos sem história de consumo significativo de álcool (Neuschwander-Tetri, 2000). Esses achados são comuns em adultos obesos ou diabéticos (Kumar, Rastogi et al., 2013).

Os estudos da fisiopatologia da doença apontam como fator desencadeante do processo o acúmulo intra-hepatocitário de triglicerídeos, com atividade inflamatória progressiva, fibrose e cirrose, podendo levar ao carcinoma hepatocelular (Merry et al., 2014). A esteatose hepática macro vesicular, característica da EHNA surge da disponibilidade e mobilização de ácidos graxos livres (AGL), da síntese hepática aumentada, da esterificação de AGL em triglicerídeos e do decréscimo do transporte destes para fora do fígado (Baldrige et al., 1995). Haveria, portanto, um desvio dos mecanismos de lipólise em favor da lipogênese (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996).

De acordo com Stefanovic e colaboradores, a obesidade também pode induzir estresse oxidativo sistêmico, devido ao aumento na produção de radicais livres na gordura acumulada, independentemente de sua localização, e consequente redução da capacidade do sistema de defesa antioxidante (Stefanovic et al., 2008).

O estresse oxidativo é uma manifestação bioquímica de agressão a biomoléculas e está associada a diversas complicações (Vaziri et al., 2004). É acompanhado do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos, alterações no DNA celular levando inclusive a morte celular (Halliwell, 2007). A correlação entre esteatose hepática e o estresse oxidativo consiste no fato de que o estresse oxidativo gera radicais livres que podem interferir no funcionamento celular do tecido hepático.

Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da flutuação de massa corporal induzida por dieta sobre os marcadores de estresse oxidativo e na estrutura do fígado.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é uma doença de etiologia multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, que se tornou um problema de saúde pública na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Huneault et al., 2011, McArdle et al., 2013).

Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que a prevalência da obesidade ajustada para a idade era de 34% e que entre os anos de 1999 e 2008 houve um aumento de oito pontos percentuais nesse índice (Flegal et al.). No Brasil, dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 realizada pelo IBGE mostram que a prevalência de obesidade cresceu quatro vezes entre os homens, de 3% para 12% e mais de duas vezes entre as mulheres, de 8% para 17% (IBGE, 2010).

Embora seja muito complexo identificar o que levou o grande crescimento da obesidade, as causas principais seriam o aumento do consumo de alimentos energéticos ricos em gorduras saturadas e açúcares, e a redução do exercício físico. Fatores como o crescimento econômico, modernização, urbanização e a globalização também impulsionam o aumento da obesidade na sociedade. O elevado padrão tecnológico da sociedade tem mudado o conceito de saúde, e a introdução de novos produtos químicos na industrialização de alimentos tem modificado os hábitos alimentares do homem (Heikal et al., 2008, Kaushik et al., 2010).

Os indivíduos obesos diferem não apenas quanto à quantidade excessiva de gordura, mas também no padrão de distribuição do tecido adiposo (Poirier et al., 2006). À medida que o indivíduo fica obeso, mudam as características dos depósitos de gordura, aumenta a deposição de gordura abdominal, intrabdominal, retroperitoneal e subcutânea e em uma fase mais avançada, ocorre deposição de gordura nos músculos, fígado e pâncreas. O armazenamento de gordura é

acompanhado de aumento progressivo dos riscos à saúde (Romero e Zanesco, 2006).

A obesidade visceral, também chamada de obesidade abdominal, androgênica ou “tipo maçã”, é a que está mais associada a comorbidades, ao contrário da distribuição de gordura chamada de ginecoide ou “tipo pera”. A obesidade visceral compreende o tecido adiposo encontrando no abdômen e que envolve os órgãos internos. Essa deposição de gordura intra-abdominal está relacionada a fatores lipogênicos como alterações hormonais, idade e fatores genéticos (Troisi et al., 1990).

Segundo Hipócrates “corpulência não é apenas uma doença em si, mas o prenúncio de outras”, reconhecendo que a obesidade é um distúrbio que pode estar relacionada a outras comorbidades. A associação de complicações decorrentes da obesidade também é economicamente prejudicial para a sociedade obrigando o Estado a investir no tratamento das doenças decorrentes da obesidade (Haslam e James, 2005).

O estilo de vida da sociedade atual tem, cada vez mais, se revelado prejudicial à saúde, devido, principalmente à associação da inatividade física com uma alimentação pouco saudável, características comuns à população ocidental (Luyckx et al., 1999). Entretanto, a obesidade não está relacionada exclusivamente ao excesso de ingestão alimentar e à inatividade física, mas pode se relacionar a fatores múltiplos e complexos, sendo assim, a obesidade apresenta uma etiologia multifatorial (Martinez et al., 2000).

Acredita-se que existam quatro fatores principais associados à gênese da obesidade: determinantes genéticos, fatores ambientais, comportamento alimentar e aumento do sedentarismo (Gurevich-Panigrahi et al., 2009). No entanto, o completo entendimento da sua fisiopatologia permanece sem resposta.

Do ponto de vista bioquímico, a obesidade também é caracterizada por um estado de estresse oxidativo crônico (Higdon e Frei, 2003), associado a processos metabólicos e inflamatórios (Hursting e Berger, 2010), levando ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo diabetes mellitus tipo 2 (DM), doenças cardiovasculares, e síndrome metabólica (SM), bem como hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (Eikelis et al., 2003), esteatohepatite não alcoólica, déficit cognitivo, neurodegeneração (de la Monte et al., 2009) e algumas formas de câncer (Shehzad et al., 2012). O estresse oxidativo parece ser o

mecanismo unificador subjacente ao desenvolvimento de comorbidades da obesidade. Evidências sugerem que um conjunto de diferentes causas de estresse oxidativo existam na obesidade: hiperglicemia, hiperleptinemia, níveis elevados de lipídeos teciduais, atividade muscular aumentada devido ao excesso de peso corporal, defesas antioxidantes inadequadas e aumento das taxas de formação de espécies reativas (Vincent e Taylor, 2006).

Além disso, a obesidade está associada a um estado de inflamação crônica no tecido adiposo, bem como em outros órgãos, onde ocorre infiltração nos tecidos como monócitos e macrófagos que aumentam em número e em atividade (Alfadda e Sallam, 2012). O estudo da obesidade é complexo e é necessário que os profissionais da área da saúde aprofundem-se em todos os aspectos que envolvem este assunto para que as intervenções possam ser mais efetivas e duradouras, atuando de forma profilática, no sentido de evitar o desenvolvimento de todos os efeitos adversos da obesidade.

1.2 Modelo animal

Para melhor entendimento do papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e suas conseqüentes alterações decorrentes, assim como fornecer subsídios que possibilitem o surgimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença, os pesquisadores utilizam-se cada vez mais, de modelos experimentais obtidos a partir da indução por dieta hiperlipídica, uma vez que esse modelo reflete de forma similar as alterações metabólicas encontradas na obesidade humana (West e York, 1998, Winzell e Ahren, 2004).

Os animais comumente utilizados para esse modelo experimental são os camundongos, sendo as linhagens isogênicas ou *inbred* (C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J, A/J) mais amplamente utilizadas. Esse tipo de linhagem é obtido a partir do cruzamento de animais consanguíneos, permitindo a criação de populações estáveis e geneticamente homogêneas (West et al., 1992).

Um dos modelos para a indução de obesidade é através da oferta de dieta hiperlipídica para mimetizar o excesso de consumo de alimentos hiperlipídicos e com elevada densidade energética que ocorre com os humanos, juntamente com pouco exercício físico. Em um estudo de Deji e colaboradores, o consumo de dieta hiperlipídica por camundongos C57BL/6 proporcionou aos animais, alterações sistêmicas compatíveis com a síndrome metabólica em humanos, incluindo obesidade, hiperglicemia e hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia (Deji et al., 2009).

Alguns estudos experimentais sugerem que a manipulação da dieta reproduz vários aspectos da síndrome metabólica em diferentes espécies animais (Portha et al., 1994). Entre estas dietas, a hiperlipídica mostrou-se capaz de induzir resistência dos tecidos periféricos à insulina e hiperinsulinemia (Lacraz et al., 2009). Além disso, a dieta rica em gordura saturada em ratos *Wistar* também pode desencadear hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia de cardiomiócitos e glomérulos (Aguila e Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Diante disso, os camundongos C57BL/6 são modelos animais mais utilizados para o estudo da obesidade e suas comorbidades (Fraulob et al., 2010).

2 Estresse Oxidativo

2.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. A produção desses agentes oxidantes é equilibrada pela remoção dos mesmos através de mecanismos de defesa antioxidantes presentes nas células. Entretanto, um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, ocasiona o processo conhecido como estresse oxidativo (Touyz e Schiffrin, 2004, Nobili et al., 2013).

Quase todas as células e todos os tecidos do corpo convertem continuamente pequenas quantidades de oxigênio molecular em ânion superóxido na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. As EROs também são produzidas por outras vias, incluindo o *burst* respiratório em fagócitos ativados, efeitos danosos da radiação ionizante sobre as membranas celulares, subprodutos de enzimas como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases [NAD(P)H oxidases], xantina oxidase (XO) e óxido nítrico sintase endotelial desacoplada (eNOS) (Stadtman e Levine, 2003, Rendo-Urteaga et al., 2014).

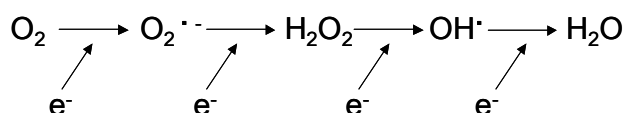
As EROs e as ERNs podem ser altamente tóxicas ao provocar danos teciduais por meio da peroxidação lipídica e da modificação de proteínas celulares e DNA, estando envolvidas, dessa forma, em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação (Catala, 2012).

Contudo, esses agentes podem participar também de processos fisiológicos como a geração de eicosanoides, fagocitose e diversas vias de transdução de sinais (Barber e Harris, 1994).

As EROs são derivadas, em sua maioria, do metabolismo do oxigênio e são encontradas em todos os sistemas biológicos (Touyz e Schiffrin, 2004). Durante o processo de redução do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água, várias EROs são formadas, dentre as quais destacam-se: o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$),

o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (Kopani et al., 2006)(Figura 1).

Figura 1 – Redução tetravalente do O_2 com formação das espécies reativas de O_2 ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$)



Fonte: Adaptado de Kopani et al., 2006.

O gás oxigênio ($\cdot\text{O}_2$) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, sendo formadas a partir dele as demais EROs. Em condições fisiológicas, a reação favorecida é a dismutação, com a formação do H_2O_2 . Entretanto, quando produzido em excesso, uma quantidade significativa de $\cdot\text{O}_2$ reage com o NO, produzindo assim o peroxinitrito (Touyz e Schiffrin, 2004).

O H_2O_2 é produzido principalmente pela dismutação do $\cdot\text{O}_2$. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados, o H_2O_2 é extremamente deletério porque, na presença de ferro, participa da reação que produz $\cdot\text{OH}$. Essa espécie reativa é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} (Fridovich, 1997, Touyz e Schiffrin, 2004).

O $\cdot\text{OH}$ é considerado o radical mais reativo em sistemas biológicos, produzindo dano no local onde é formado. A combinação extremamente rápida do $\cdot\text{OH}$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Além disso, o $\cdot\text{OH}$ pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGP) das membranas celulares (lipoperoxidação) (Kopani et al., 2006).

2.2 Peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém, a membrana celular é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica,

que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da mesma (Mello Filho et al., 1984). A peroxidação lipídica das membranas resulta em perda de AGP com consequente diminuição da fluidez da membrana. Além disso, pode levar à perda da atividade enzimática, de carreadores e de receptores, apresentando efeitos deletérios sobre as funções secretoras de membrana (De Marchi et al., 2013). Se prolongada, a peroxidação lipídica pode resultar em perda completa da integridade da membrana (Halliwell, 2007, De Marchi et al., 2013).

Os radicais produzidos na reação propagam a cadeia de peroxidação lipídica, retirando cada vez mais átomos de hidrogênio do AGP para formar hidroperóxidos e novos radicais de carbono, levando à oxidação de muitas moléculas e ácidos graxos (Jialal e Grundy, 1992). O processo se torna mais complexo à medida que tanto o grau de insaturação como a gravidade das condições de peroxidação aumentam (Halliwell, 2007).

Os produtos finais da peroxidação lipídica incluem aldeídos e hidrocarbonetos gasosos, sendo o mais frequentemente mensurado o malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído de cadeia curta, medido pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Janero, 1990). Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (Bonnes-Taourel et al., 1992).

2.3 Oxidação de proteínas

As EROs também podem levar a destruição de proteínas através da oxidação de grupamentos sulfidril, que podem ser medidos pelo método de carbonilação de proteínas, além de poderem oxidar o DNA (Halliwell, 1996).

A técnica que tem como princípio a reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine et al., 1990).

Proteínas carboniladas são geralmente menos ativas e menos termoestáveis. O aumento do nível de proteínas carbonil pode ocasionar efeitos deletérios sobre

funções orgânicas, visto que promovem mudanças conformacionais na estrutura proteica e causam perda de função catalítica nas proteínas afetadas (Stadtman e Levine, 2003, Baraibar et al., 2012). Processos como fragmentação, agregação, além de maior susceptibilidade a proteases, exemplificam mais algumas das ações das EROs sobre as proteínas (Yu, 1994).

2.4 Sistema de defesa antioxidante

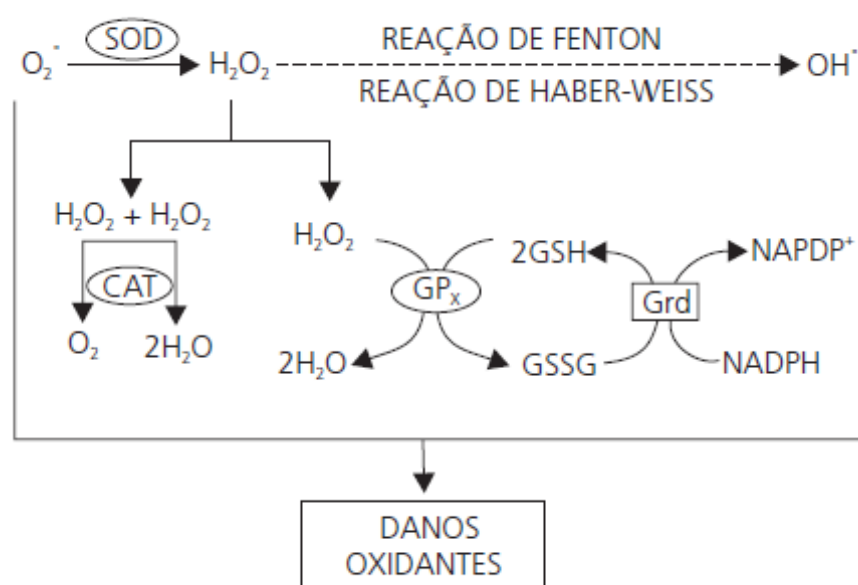
Para se proteger e evitar os danos causados pelas EROs, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes (Kojo, 2004, Valko et al., 2007). Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos conforme sua estrutura. A maior parte dos antioxidantes não enzimáticos é exógena. Os principais são vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina E, betacaroteno); vitaminas hidrossolúveis (C e complexo B) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido-desmutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx), é o primeiro sistema a agir, evitando o acúmulo de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 . Os agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana (Kojo, 2004, Valko et al., 2007).

A SOD é a primeira linha de defesa da célula. Em mamíferos existem três isoformas: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-manganês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (ecSOD, SOD3) (Paravicini e Touyz, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do ânion O_2^- em H_2O_2 e O_2 (Acharya et al., 1991) (Figura 2).

A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos através da utilização da glutathione (GSH), que atua como co-substrato da glutathione peroxidase, com propriedades de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada através da glutathione redutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH (Valko et al., 2007, Paravicini e Touyz, 2008) (Figura 2).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 2). A catalase é efetiva em altos níveis de estresse oxidativo e protege as células da produção de H_2O_2 , sendo que a suplementação com catalase exógena previne a oxidação da GSH (Vaziri et al., 2004).

Figura 2 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos



Legenda: SOD, superóxido desmutase; CAT, catalase; GPx, glutatona peroxidase; Grd, glutatona redutase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada.

Fonte: Adaptado de Barbosa et al., 2010.

2.5 Doença gordurosa hepática não alcoólica

O termo doença gordurosa hepática não alcoólica (DGHNA) foi utilizado pela primeira vez em 1980 por Ludwig e colaboradores para designar um achado histopatológico semelhante à esteatose hepática induzida pelo consumo de álcool, porém acometendo pacientes sem consumo significativo de álcool (Ludwig et al., 1980). Desde 1800, alguns patologistas já descreviam a associação da esteatose e cirrose. Nessa época, o álcool foi imputado como desencadeante do processo.

Posteriormente, foi observado que um grupo que não consumia álcool desenvolvia esteatose seguida de fibrose hepática sem causa aparente. Os casos pareciam estar associados com obesidade, sexo feminino e diabetes (Moran et al., 1983).

Um aspecto importante a ser observado é o aumento na incidência de doença gordurosa hepática não alcoólica tornando-se um problema clínico emergente entre os obesos, mesmo em crianças e adolescentes (Moran et al., 1983). A DGHNA inclui um amplo espectro de alterações no tecido hepático (Roberts, 2007). Inicialmente se observa infiltração hepática de gordura (esteatose), podendo evoluir com atividade inflamatória e necrose, com ou sem fibrose perissinusoidal (esteatohepatite), fibrose avançada e cirrose (Festi et al., 2004, Papandreou et al., 2007). Tominagata e colaboradores (Tominaga et al., 1995) observaram que 20% dos pacientes obesos com esteatose hepática desenvolvem cirrose e/ou carcinoma hepatocelular por isso o diagnóstico precoce se faz tão importante (Palekar et al., 2006).

As tentativas de esclarecimento da patogênese da DGHNA tiveram início com a compreensão do metabolismo dos lipídeos no organismo normal de pessoas saudáveis (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996).

A gordura é absorvida pela mucosa intestinal e passa à circulação na forma de quilomícrons. Estes, por sua vez, contêm triglicerídeos, que são depositados no tecido adiposo, servindo de reserva para os gastos metabólicos quando há privação de alimentos (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996). O tecido adiposo libera a gordura na forma de ácidos graxos livres (AGL) mediante o estímulo da adrenalina, corticosteroides e outros hormônios. Os AGL têm dois destinos após a entrada nos hepatócitos: são oxidados pelas mitocôndrias para gerar energia (ATP) ou são convertidos novamente em triglicerídeos, acoplados às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e transportados ao tecido adiposo (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996).

A DGHNA surge da disponibilidade, mobilização, síntese hepática aumentada e da esterificação de AGL em triglicerídeos e do decréscimo do transporte destes para fora do fígado (Baldrige et al., 1995). Haveria, portanto, um desvio dos mecanismos de lipólise em favor da lipogênese (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996, Diehl, 1998).

Um estudo feito em ratos *Wistar* demonstrou que a deposição aguda ou crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação de lipídeos, e que o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da esteatose (Baldrige et al., 1995). O

estresse oxidativo gera radicais hidroxila e superóxidos que reagem com o excesso de lipídeos para formar os peróxidos. O aumento da peroxidação de lipídeos estaria relacionado com a dieta, o meio ambiente, infecções, drogas, toxinas e com a predisposição genética (Lavine, 2000).

Um dos produtos finais da peroxidação de lipídeos é o malondialdeído que ativa a produção de colágeno com consequente fibrose (Nobili et al., 2013, Serviddio et al., 2013). Além disso o malondialdeído ativa o fator de necrose tumoral (TNF) responsável pela expressão das citocinas, incluindo o TNF, interleucina-8 e interleucina-6 (Baldrige et al., 1995, Nobili et al., 2013). O TNF age como potente inibidor da lipase lipoprotéica acarretando diminuição da lipólise nos tecidos periféricos e consequente acúmulo de triglicérides no fígado (Serviddio et al., 2013). As citocinas promovem a resposta inflamatória, que tem como evento final a lesão peroxidativa das membranas lipídicas e eventual necrose dos hepatócitos.

Até o presente momento, não se conseguiu correlacionar o grau de indução de citocinas com o estágio da doença hepática (Serviddio et al., 2013), mas há crescentes evidências de que o mecanismo comum de lesão na esteatose alcoólica e na não alcoólica seria o aumento da peroxidação de lipídeos, o que explicaria os mesmos achados histopatológicos nas duas doenças (Baldrige et al., 1995, Nobili et al., 2013). Sabe-se também, que o fígado com esteatose seja mais susceptível às agressões, em geral, do que o fígado normal (Neuschwander-Tetri e Bacon, 1996, Serviddio et al., 2013).

Com os avanços no conhecimento dos mecanismos patogênicos da DGHNA poderão ser desenvolvidas estratégias mais racionais e específicas de prevenção e tratamento da doença. Diante disso, faz-se necessário perceber as relações existentes entre o estresse oxidativo e a DGHNA.

3 DIETA NO TRATAMENTO DA OBESIDADE

A alimentação é uma necessidade humana vital (Lawrence, 1999, Heaner e Walsh, 2013) na qual a comida e o ato de se alimentar representam elementos de interação humana familiar e social, com conotações simbólicas (Heaner e Walsh, 2013). O comportamento alimentar é um fenômeno complexo, que vai além do ato de comer (Abbate-Daga et al., 2013, Heaner e Walsh, 2013). Barnes e colaboradores também relacionam a ingestão de alimentos a estímulos internos e externos, considerando fatores orgânicos, psicológicos e sociais (Barnes et al., 1997). Desse modo, o ato de comer transcende o valor nutritivo e as características sensoriais do alimento, possuindo motivações ocultas relacionadas às carências psicológicas e às vivências emotivas e conflituosas que independem da fome (Brown, 1991).

Para evitar que a prevalência da obesidade continue crescendo, surge a necessidade de adotar-se medidas de prevenção. Estas podem ser através do aumento do gasto energético ou pela diminuição na ingestão energética (Lankford et al., 2013). Neste sentido, é crescente o surgimento de dietas populares para combater a obesidade ao longo das últimas três décadas (Ma et al., 2007).

Métodos que prometem perda de peso rápida são ofertados aos interessados, dentre tais métodos destacam-se regimes severos e a prescrição médica indiscriminada de moderadores de apetite, fórmulas e ansiolíticos, os quais, na maioria das vezes, resultam em consequências desastrosas como: desequilíbrio metabólico e o popularmente conhecido “efeito sanfona” (Sharma e Branscum, 2010). Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia deve haver uma intervenção medicamentosa somente nos casos em que as alternativas não medicamentosas falharem e nos casos mais graves de obesidade.

O tratamento da obesidade, entretanto, continua produzindo resultados insatisfatórios, em grande parte por estratégias equivocadas e pelo uso insuficiente dos recursos terapêuticos (Johansson et al., 2014). A intervenção nutricional é vista como um gigantesco desafio ao indivíduo obeso, que apresenta dificuldade em seguir o tratamento para perda de peso. Segundo a OMS, cerca de 95% dos obesos que seguem dieta para emagrecer fracassam na manutenção do corpo mais magro (Sjöström et al., 1999). Os altos percentuais de insucessos terapêuticos e de

recidivas podem apresentar graves repercussões orgânicas e psicossociais (Sjöström et al., 1999). Para isso, não se concebem atualmente, tratamentos isolados. As ações são preconizadas por qualificação multiprofissional e ciência de todas as dificuldades que inclui o tratamento sistematizado da obesidade (Sjöström et al., 1999). Atualmente, existem diversas formas de tratamento, onde a utilização de fármacos e intervenção cirúrgica são geralmente usados como auxiliares ao tratamento convencional, que consiste basicamente em mudanças comportamentais (McKay e Blumberg, 2002).

No decorrer do tratamento da obesidade, o organismo dispõe de mecanismos que visam impedir a redução de peso durante um déficit energético. Trata-se de um mecanismo eficaz desenvolvido para aumentar a sobrevivência durante a carência alimentar (Morgen e Sorensen, 2014). Caso haja acesso irrestrito a alimentos, o organismo procura recuperar o peso perdido para estar apto a uma nova e hipotética situação de privação de alimento. Este dispositivo certamente assegurou a sobrevivência dos primeiros seres humanos e é um dos fatores que podem explicar a dificuldade enfrentada por um indivíduo obeso durante o processo de emagrecimento (Brown, 1991, Morgen e Sorensen, 2014).

Nos estudos com intervenções dietoterápicas de substituições de refeições ou com dietas muito restritas em energia, foi observada maior perda ponderal ao final de seis meses (-10% e -16% do peso inicial, respectivamente). Entretanto, esse tipo de intervenção foi acompanhado de rápida recuperação de peso aos doze meses de seguimento (Franz et al., 2007).

Percebe-se então que a grande problemática está na manutenção do peso perdido após a dieta. O “efeito sanfona” ocorre frequentemente em pessoas com sobrepeso e obesas em suas tentativas de perder massa corporal (Blackburn et al., 1989). Sabe-se que perdas e ganhos de massa corporal aumentam os riscos de comorbidades e mortalidades decorrentes da obesidade (Field et al., 2009, Taing et al., 2012).

Diante do exposto o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos que a perda e/ou o ganho de massa corporal, tem sobre os marcadores de estresse oxidativo e na esteatose hepática não alcoólica.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da perda e do ganho de massa corporal sobre os marcadores de estresse oxidativo no fígado e sua associação com a presença de esteatose e provas de função hepática, índice de adiposidade, perfis lipídico e glicêmico em camundongos machos da linhagem C57BL/6.

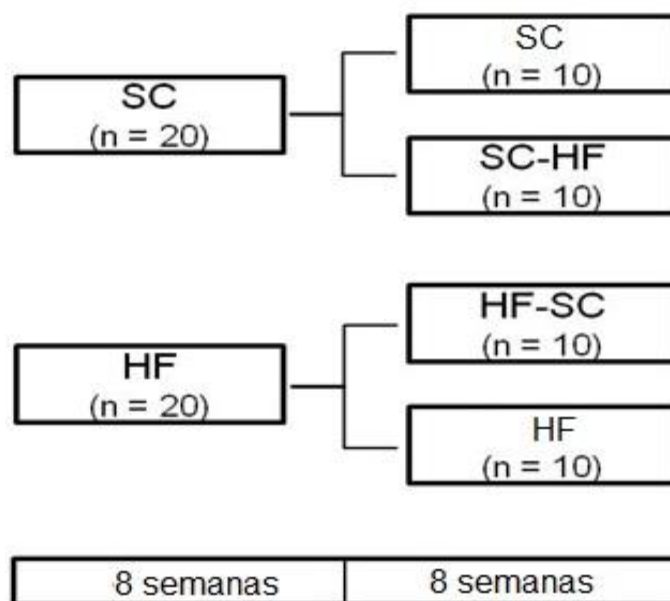
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 de três meses de idade, obtidos no biotério da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Campinas, SP, Brasil). Os animais foram alocados em caixas de polipropileno, com temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) controladas. O ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro e escuro (claro de 01:00h às 13:00h) e ciclo de exaustão de ar (15 min/hora). Os animais tiveram livre acesso à ração e à água. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA/033/2011).

Vinte animais receberam ração padrão (*standard chow*, SC, 10% da energia total proveniente de lipídeos), durante dois meses, logo após, foram reagrupados em dois grupos: i) de 10 camundongos permaneceram recebendo dieta controle por mais dois meses (grupo SC), e ii) 10 camundongos foram transferidos para a dieta rica em lipídeos (*high-fat*, HF, 50% da energia total proveniente de lipídeos) durante dois meses (grupo SC-HF). O mesmo esquema foi usado para a dieta HF. Vinte animais receberam dieta HF durante dois meses, logo após foram divididos em grupos de: iii) 10 animais permaneceram na dieta HF por mais dois meses (grupo HF) e, iv) 10 animais foram transferidos para a dieta SC por dois meses (grupo HF-SC) como esquematizado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema do desenho experimental utilizado no estudo



Legenda: Grupo Controle (SC); Grupo Hiperlipídico; Grupo controle- hiperlipidico (SC- HF); Grupo hiperlipídico – controle (HF – SC).

Nota: Aos três meses de idade os camundongos machos foram divididos em dois grandes grupos, um grupo que recebeu dieta padrão (SC) e outro que recebeu dieta hiperlipídica (HF). Após oito semanas de administração da dieta, esses grupos foram redivididos perfazendo quatro grupos, o grupo SC, o grupo SC-HF, o grupo HF e o grupo HF-SC que perdurou por mais oito semanas.

Fonte: A autora, 2014.

5.2 Dietas experimentais

As dietas foram confeccionadas pela PragSoluções (PragSolucoes, Jau, SP, Brasil), de acordo com as recomendações AIN-93M (Reeves et al., 1993). A dieta controle (*standard chow*, SC) foi composta por 76% da energia proveniente de carboidratos, 14% da energia proveniente de proteínas e 10% da energia proveniente de lipídios, resultando em uma densidade energética de 16kJ/g. A dieta hiperlipídica (*high-fat*, HF) foi composta por 36% da energia proveniente de carboidratos, 14% da energia proveniente de proteínas, 50% da energia proveniente de lipídios. A dieta hiperlipídica apresentava 21kJ/g. Os teores de minerais e vitaminas foram idênticos em ambas as dietas e os animais tiveram livre acesso à

comida e água durante o período experimental. A composição detalhada das dietas padrão e hiperlipídica encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das dietas utilizadas no experimento

Nutrientes (g/Kg de ração)	Dieta SC	Dieta HF
Caseína	140	175
Amido de milho	465,7	192,6
Amido dextrinizado	155	155
Sacarose	100	100
Óleo de soja	40	40
Banha de porco	0	238
Celulose	50	50
Mistura de minerais*	35	35
Mistura de vitaminas*	10	10
L-cistina	1,8	1,8
Cloreto de Colina	2,5	2,5
BHT**	0,008	0,06
Energia (kJ)	15909	20934
Carboidrato (% energia)	76	36
Proteína (% energia)	14	14
Lipídeo (% energia)	10	50

Legenda: SC, dieta padrão para roedores, *standard chow*; HF, dieta hiperlipídica, *high-fat*. B.H.T para hidróxido de Tolueno Butilato. * Vitaminas e ** Minerais presentes na mistura estão de acordo com a AIN93M

Fonte: A autora, 2014.

5.3 Massa corporal, ingestão alimentar

A ingestão dietética foi monitorada diariamente através da verificação do resto-ingestão, que se obtém ao mensurar a ração restante na gaiola e subtrair esse valor da quantidade de ração oferecida no dia anterior. Esse valor é, então, dividido pelo número de animais por gaiola. A quantidade de ração consumida (g) foi multiplicada pela energia da dieta (kJ/g de dieta) para obter a ingestão energética diária por camundongo.

A massa corporal dos animais foi aferida semanalmente em balança digital com precisão de 0,01g (Marte A-1500) sempre no mesmo horário.

5.4 Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado três dias antes do sacrifício. A glicemia foi medida após jejum de seis horas (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de solução de glicose 25% (1,0g glicose/kg) por gavagem orogástrica. As concentrações dos níveis de glicose no sangue foram medidas pelo método da glicose-oxidase, utilizando o glicosímetro (*Accu-Chek*, Roche, São Paulo, SP, Brasil). Os resultados geraram curvas glicêmicas, que foram avaliadas posteriormente através de um gráfico com medição da área sob a curva (a.s.c.) utilizando o software *GraphPad Prism v.6.0* (*GraphPad Inc.* CA, EUA). O sangue foi coletado por uma pequena incisão na cauda do animal.

5.5 Eutanásia

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódio (0,42mg/g, i.p.) e o sangue coletado por punção cardíaca em

tubos contendo heparina após seis horas de jejum. O fígado foi coletado, dissecado e pesado, fixado em formalina de *Millonig* e processado para microscopia de luz, além do congelamento a -80°C para análises de Western Blotting, PCR em tempo real e análise da atividade das enzimas antioxidantes.

O tecido adiposo branco subcutâneo, retroperitoneal e epididimal foram dissecados e pesados a fim de se calcular o índice de adiposidade. O índice de adiposidade é determinado pela razão entre a soma das gorduras intra-abdominal e subcutânea, dividido pelo total da massa corporal, apresentado como porcentagem (Amato e Giordano, 2014).

O sangue coletado foi centrifugado (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha a 120g durante 15min) para a obtenção do plasma, este foi armazenado a -80°C até a realização de outras análises.

5.6 Análise do perfil lipídico

O colesterol total e os triglicerídeos foram avaliados no plasma através de teste enzimático colorimétrico (*Kit* Bioclin, Minas Gerais, Brasil).

5.7 Análise da função hepática

A função hepática foi avaliada através de análises específicas no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto. Foram avaliados: alanino amino transferase (ALT), bilirrubina e proteínas totais (Cobas 6000®, Roche, Brasil)

5.8 Análise do tecido hepático

O fígado dos animais selecionados foi pesado em balança analítica digital de acurácia de 0,001g (Balança analítica de precisão BL-3200H) e o seu volume foi

determinado pelo método de *Scherle* (Scherle, 1970). Para análise histológica os fígados foram fixados em formalina a 4% para posterior processamento. Foi selecionado um pedaço de cada um dos cinco lóbulos de cada animal, para processamento. Ao selecionar uma amostra de cada um dos lóbulos é garantido que houve a análise do órgão como um todo.

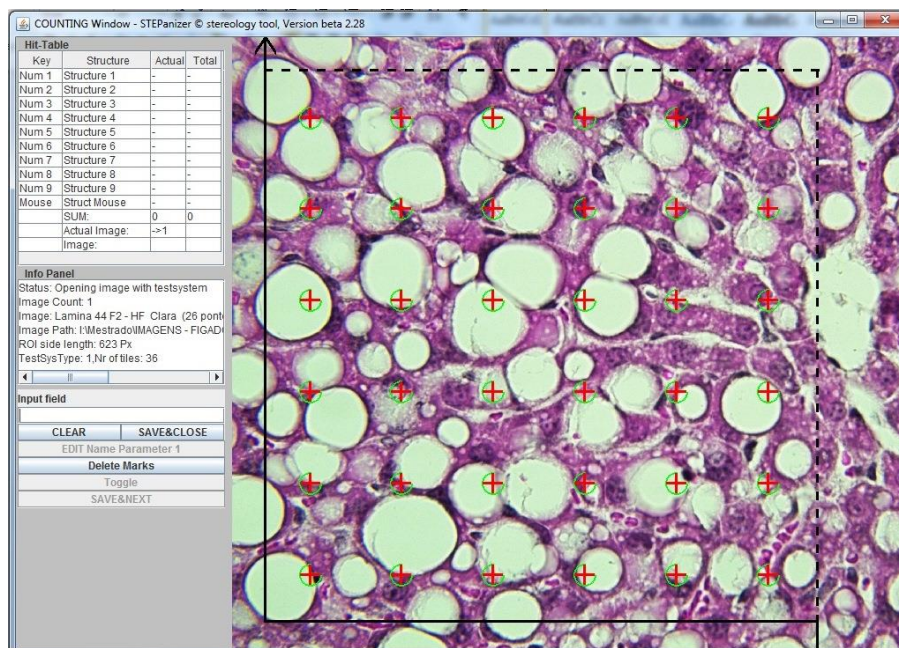
Foi realizado o processamento dos órgãos conforme a técnica histológica convencional, ou seja, desidratado em banhos com concentrações crescentes de álcool, diafanizado em xilol e incluídos em blocos de *paraplast*.

Os blocos de *paraplast* foram seccionados a 5 μ m (micrótomo rotativo manual Med Steel) e corados com hematoxilina-eosina. Dez fotomicrografias digitais foram obtidas por animal para avaliação da esteatose hepática (formato TIFF, 24bits, 1280 x 1024 pixels), câmera digital *Infinity 1-5C* (Lumenera Co. Ottawa, ON, Canadá), microscópio Leica DMRBE (Leitz Wetzlar, Alemanha). Cinco campos microscópicos aleatórios por animal foram analisados. Um sistema-teste com 36 pontos (P_T) foi produzido pelo programa baseado na web STEPanizer e sobreposto às fotomicrografias conforme Figura 4. Estimou-se a densidade de volume de esteatose hepática $Vv[\text{esteatose}]$ como:

$$Vv[\text{esteatose}] = Pp[\text{esteatose}]/P_T,$$

Onde Pp representa o número de pontos do sistema-teste contados na gordura intra-hepatócitos (Aguila et al., 2003).

Figura 4 - Esteatose hepática quantificada através da contagem de pontos



Nota: Imagens digitais foram adquiridas e a esteatose hepática foi quantificada através da contagem dos pontos que tocavam as gotas de gordura, sendo desconsiderados aqueles que tocavam a linha proibida, utilizando o software STEPanizer (www.stepanizer.com)

Fonte: Tschanz e colaboradores 2011.

5.9 Dosagem de Proteínas

A mensuração das proteínas foi feita através de um ensaio colorimétrico, utilizando-se o *Kit* para dosagem de proteínas BCA (BioAgency Laboratórios, São Paulo, Brasil).

5.10 Western blotting

O fígado (100mg) foi adicionado ao tampão de *lise* RIPA (radioimunoprecipitação) com inibidor de protease, homogeneizados e centrifugados (4500 rpm durante 20 minutos a 4°C) para posterior quantificação da concentração proteica.

Após desnaturação (cinco minutos a 100°C), quantidades iguais de proteínas (~100 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) e transferidas do gel para a membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) por eletrotransferência *semi-dry*. A membrana foi então bloqueada por incubação em 6% (w/v) de albumina, diluída em tampão salina com Tris (TBS-T [20mmol/L de Tris/HCl (pH 7,4) e 500mmol/L de NaCl]) em temperatura ambiente, durante uma hora para evitar ligações inespecíficas.

Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário de interesse *overnight*, a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico para sua origem. A reação foi revelada por quimioluminescência e as imagens obtidas com o sistema ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A intensidade das bandas foi quantificada usando o *software* ImageJ (NIH, imagej.nih.gov/ij, USA).

O complexo de ligação do anticorpo foi retirado e a membrana foi remarcada com beta-actina (SC81178, Santa Cruz Biotecnologia), como proteína constitutiva para normalizar os dados obtidos pelo *Western blotting*.

5.11 RT- PCR em tempo real

Parte do fígado (30mg) teve seu RNA total extraído utilizando 700µl de Trizol (Invitrogen, CA, USA). Em seguida, adicionaram-se 100µL de clorofórmio, seguido de centrifugação (11.200 rpm, durante dez minutos a 4°C), retirou-se o sobrenadante da fase aquosa, que corresponde ao RNA. A esse, adicionaram-se 250µL de isopropanol para precipitação do RNA, com posterior centrifugação (11.200 rpm, durante 10 minutos a 4°C) e formação de um pellet de RNA. Então, retirou-se totalmente o isopropanol, ressuspensando com 500µL de etanol 70% e seguido de centrifugação (11.200 rpm, durante cinco minutos a 4°C). O etanol foi totalmente retirado e o *pellet* ressuspensado em 40µL de água deionizada (MilliQ). A concentração de RNA foi determinada através de espectroscopia utilizando o equipamento *Nanovue* (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e acrescentou-se DNase I (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado utilizando *primers* Oligo (dT) para RNAm e Superscript III transcriptase-reversa (Invitrogen, CA, USA). O

PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Biorad CFX96 e mix SYBR Green (Invitrogen, CA, USA). Os *primers* foram gerados utilizando o *software* online Primer3, e estão indicados na Tabela 2. Os controles endógenos beta-actina e TBP foram utilizados para corrigir a expressão dos genes-alvo. A eficiência da corrida dos genes-alvo e dos genes endógenos foram aproximadamente iguais, sendo calculada através de diluições em série do cDNA. As reações de PCR foram realizadas depois de um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4min a 95°C), foram realizados 44 ciclos e cada ciclo consistindo em 95°C durante 10s e 60°C durante 15s, seguidos por uma curva de *melting* (60 a 95°C, com taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram de poços em que cDNA foi substituído por água deionizada. A razão de expressão relativa (QR) de RNAm foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que ΔCt expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da média dos controles endógenos.

5.12 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídios de membrana foi determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído – MDA), que são substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro. Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper & Hadley e adaptada para tecido hepático (Draper e Hadley, 1990).

Foram adicionados 200µl do homogenato de fígado para 400µl de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por 10min em 1000 rpm a 4°C. Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532nm; Genesys™10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA). A concentração de TBARS foi expressa como nM/g de proteína.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados no experimento

Genes	5'-3'	Primers
Beta-actina	FW	CTCCGGCATGTGCAA
	RV	CCCACCATCACACCCT
TBP	FW	CAGCCTTCCACCTTATGCTC
	RV	CCGTAAGGCATCATTGGACT
SOD	FW	AACCATCCACTTCGAGCAGA
	RV	GGTCTCCAACATGCCTCTCT
Catalase	FW	ACATGGTCTGGGACTTCTGG
	RV	CAAGTTTTTGGATGCCCTGGT
GPX	FW	GTCCACCGTGTATGCCTTCT
	RV	TCTGCAGATCGTTCATCTCG
GR	FW	CACGACCATGATTCCAGATG
	RV	CAGCATAGACGCCTTTGACA

Legenda: TBP, TATA *box binding protein*; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutationa peroxidase; GR, glutationa redutase.

Fonte: A autora, 2014.

5.13 Carbonilação de proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente $22.0000 \text{ Molar}^{-1}$ em nmol/mg de proteínas (Levine et al., 1990).

Foi utilizado 100µl de homogenato de fígado em duplicata. Foram realizadas lavagens com solução de HCL-Acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-acetato de etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrofenilhidrazina e outra parte incubada com HCL 2M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro (370nm; Genesys™ 10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA).

5.14 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foi realizada em homogenato de fígado preparado com tampão fosfato. Para cada enzima seguiu-se protocolo de realização específico.

5.14.1 Medida da Superóxido Dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ em O_2 e H_2O_2 . A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo $\bullet\text{O}_2^-$. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Parker e colaboradores para a medida no plasma, e adaptando-a para o tecido hepático (Parker et al., 1984).

Foram utilizados 20, 40 e 60µl de cada amostra em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970µl tampão glicina (3,75mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20µl da enzima catalase (1,2mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o H_2O_2 formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida

espectrofotometricamente (480nm; Genesys™10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA) em um intervalo de 180 segundos.

5.14.2 Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 , formando oxigênio molecular e H_2O . A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de H_2O_2 pela reação.

Foram utilizados 200 μ l de homogenato de fígado em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2 (0,16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos por espectrofotometria (240nm; Genesys™10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA) em um intervalo de 60 segundos (Aebi, 1984).

5.14.3 Medida da Glutaciona Peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutaciona (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340nm.

Foram utilizados 200 μ l de homogenato de fígado, incubadas com 1800 μ l de tampão fosfato (PBS), glutaciona reduzida (2mM), glutaciona redutase (0,11mg/mL) e azida sódica (0.065mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H_2O_2 (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340nm; Genesys™10SUV- Vis Spectrophotometer – EUA). Esta

padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé & Gunzler e adaptada para o tecido estudado (Flohe e Gunzler, 1984).

5.15 Análise estatística

Os dados obtidos foram apresentados em forma de média \pm erro padrão da média (EPM). A diferença estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma entrada (*one way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Holm Sidak. Em todos os casos, o valor de *P* menor ou igual a 0,05 foi aceito como estatisticamente significativo. As análises e o preparo dos gráficos foram realizados no programa de análise estatística *GraphPad Prism* versão 6.0 para Windows (*GraphPad Inc. CA, EUA*).

6 RESULTADOS

6.1 Ingestão alimentar

Como a densidade energética entre as dietas SC e HF diferem entre si, os animais dos grupos HF e SC-HF apresentaram uma ingestão energética diária significativamente maior ao final do estudo (HF: $66,1 \pm 1,7$ kJ; SC-HF: $60,2 \pm 2,5$ kJ) que os animais dos grupos SC e HF-SC (SC: $50,6 \pm 1,7$ kJ; HF-SC: $43,1 \pm 2,5$ kJ).

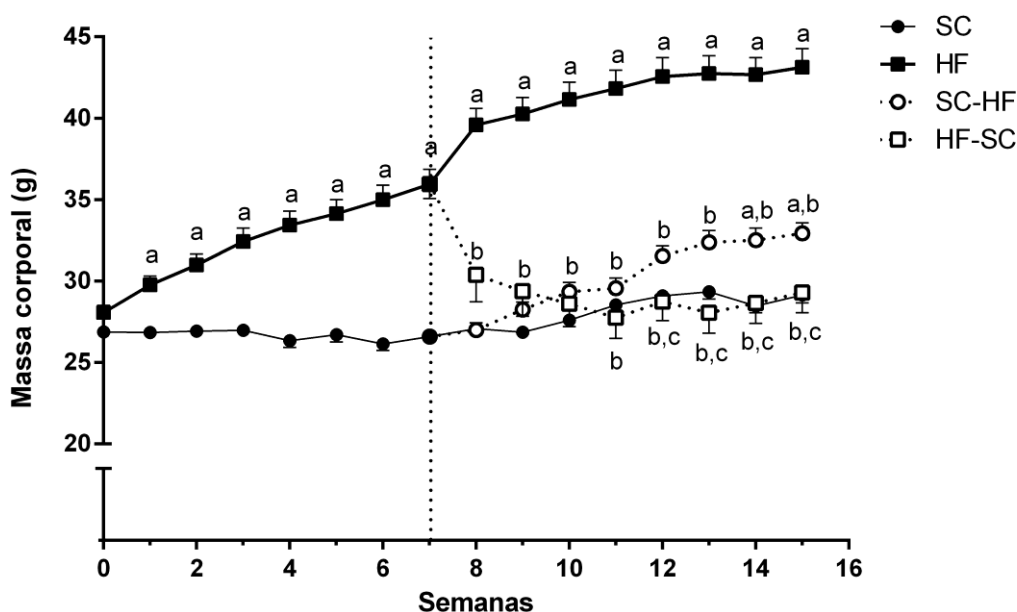
6.2 Massa corporal

Os animais iniciaram o experimento com a massa corporal similar. Durante o fornecimento das dietas experimentais, o ganho de massa corporal entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica foi maior, apesar de não haver diferença na quantidade de ração consumida.

O grupo SC-HF, após a troca de dieta SC para HF, apresentou aumento significativo da massa corporal. E o grupo HF-SC, após a troca da dieta HF para SC, apresentou diminuição significativa da massa corporal assemelhando aos valores do grupo SC.

Conforme consta na Figura 5, na segunda semana já era possível ver diferença significativa na massa corporal dos animais.

Figura 5 – Evolução da massa corporal dos quatro grupos estudados ao longo do período experimental



Legenda: Grupo Controle (SC); Grupo Hiperlipídico; Grupo controle- hiperlipídico (SC- HF); Grupo hiperlipídico – controle (HF – SC). Os dados são apresentados em média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF, [c] vs grupo SC-HF (n=10 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

6.3 Perfil lipídico

A análise do colesterol total sérico demonstrou que o grupo HF que recebeu dieta hiperlipídica durante todo o experimento e o grupo que trocou a dieta SC para HF (grupo SC-HF) apresentaram valores mais elevados de colesterol sérico quando comparado aos grupos SC e HF-SC conforme descrito na Tabela 3.

No que se refere à análise sérica de triglicerídeos, constatou-se que não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

6.4 Tolerância à glicose

Ao final do experimento, foi observado que os níveis glicêmicos basais dos animais do grupo HF eram maiores em comparação ao grupo SC. O grupo SC- HF e o grupo HF-SC apresentaram valores menores de glicemia de jejum quando comparados ao grupo HF, mas sem diferença quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

Em relação ao TOTG foi observada tolerância à glicose no grupo HF em relação aos demais grupos. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos SC, SC-HF e HF- SC (Tabela 3).

Tabela 3 – Perfil lipídico e glicídico nos diferentes grupos experimentais

Dados	Grupos			
	SC	HF	SC-HF	HF-SC
Glicose (mmol/L)	9,0±0,7	15,6±0,5 ^a	11,2±0,5	11,6±3,2
TOTG (a.s.c; u.a)	1104±36	1481±112 ^a	1095±28 ^b	956±10 ^b
Colesterol (mmol/L)	3,5±0,2	5,8±0,2 ^a	4,6±0,1 ^{a,b}	3,4±0,3 ^{b,c}
Triglicerídeos (mmol/L)	0,54±0,07	0,62±0,02	0,53±0,10	0,67±0,04

Legenda: Valores apresentados em média±EPM. TOTG, teste oral de tolerância à glicose; a.s.c, área sob a curva. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF, [c] vs SC-HF (n=10 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

6.5 Avaliação das provas de função hepática

O estudo das enzimas indicativas de função hepática evidenciou aumento da ALT no grupo HF em relação aos outros grupos experimentais. Bilirrubina total e proteínas totais não foram afetadas pela dieta HF conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Provas de função hepática nos diferentes grupos experimentais

Dados	Grupos			
	SC	HF	SC-HF	HF-SC
ALT (U/L)	11±2	49±10 ^a	18±4 ^b	13±4 ^b
Bilirrubina total (mg/dL)	0,07±0,10	0,07±0,10	0,08±0,10	0,07±0,01
Proteínas totais (g/dL)	4,4±0,1	4,8±0,1	4,6±0,1	4,8±0,1

Legenda: ALT, alanina aminotransferase. Valores apresentados em média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF, [c] vs SC-HF (n=10 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

6.6 Índice de adiposidade

A gordura intra-abdominal (gordura retroperitoneal+gordura epididimária) e a gordura subcutânea se mostraram aumentadas nos grupos HF e SC-HF em relação aos grupos SC e HF-SC. O mesmo aconteceu com o índice de adiposidade, que foi maior nos grupos HF e SC-HF (Tabela 5).

Tabela 5 – Índice de adiposidade dos animais ao fim do período experimental

Tecido adiposo	Grupos			
	SC	HF	SC-HF	HF-SC
Gordura intra-abdominal (g)	0,9±0,1	3,0±0,2 ^a	2,6±0,2 ^{a,b}	0,9±0,1 ^{b,c}
Gordura subcutânea (g)	0,30±0,05	1,71±0,09 ^a	0,87±0,07 ^{a,b}	0,34±0,03 ^{b,c}
Índice de adiposidade (%)	3,1±0,3	6,9±0,4 ^a	7,2±0,4 ^a	3,2±0,2 ^{b,c}

Legenda: Valores apresentados em média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF, [c] vs SC-HF (n=10 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

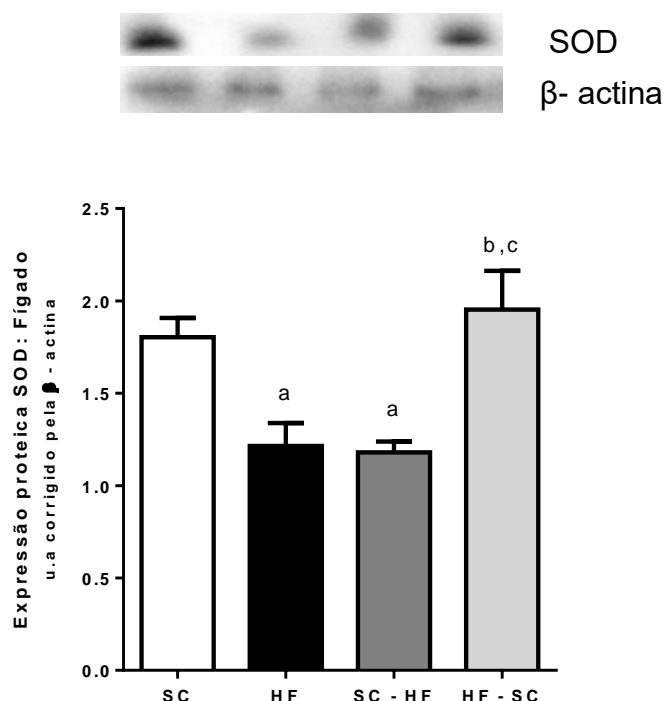
7 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

7.1 Superóxido dismutase (SOD)

7.1.1 Western Blotting

A expressão proteica de SOD diminuiu nos grupos HF e SC-HF quando comparados ao grupo SC. O grupo HF-SC apresentou aumento significativo da expressão proteica da enzima antioxidante SOD quando comparado aos grupos HF e SC-HF.

Figura 6 – Níveis proteicos de superóxido dismutase no tecido hepático



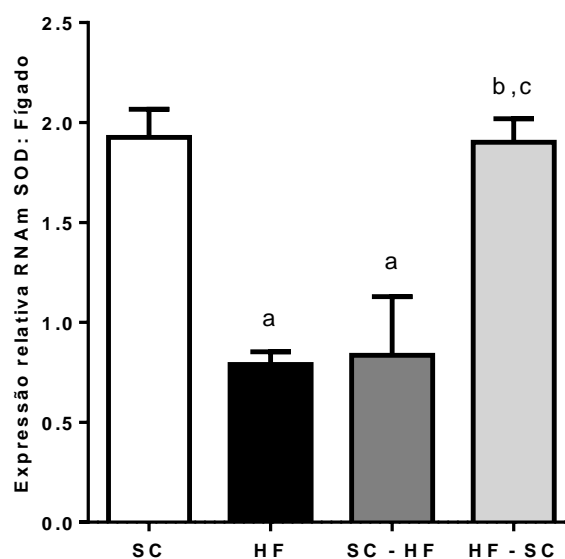
Legenda: Imagens representativas das expressões da SOD e β -actina por *Western blotting* são apresentadas acima do gráfico. Os dados são apresentados em média \pm EPM da razão SOD/ β -actina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC- HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.1.2 RT-PCR em tempo real

Em relação à expressão gênica da SOD observou-se diminuição da SOD no grupo HF e no grupo SC-HF quando comparadas aos grupos SC e HF- SC.

Figura 7 – Expressão gênica da enzima superóxido dismutase no tecido hepático



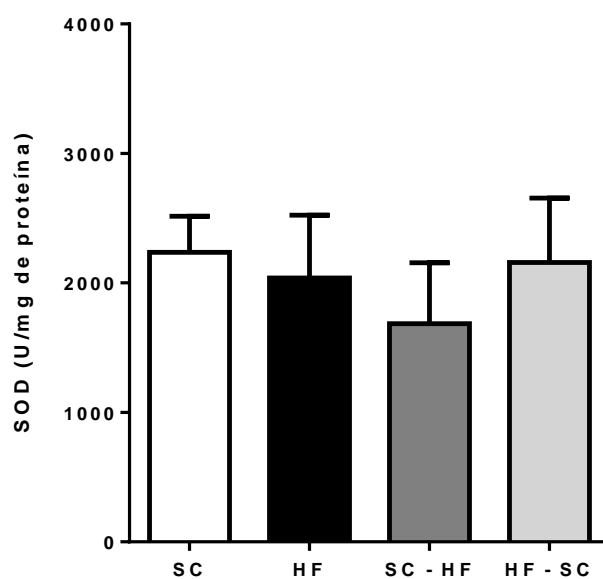
Legenda: Análise realizada por RT-PCR em tempo real do fígado para SOD. Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC- HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.1.3 Atividade enzimática

A atividade da enzima SOD não apresentou diferenças significativas quando os grupos experimentais foram comparados entre si.

Figura 8 – Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido hepático



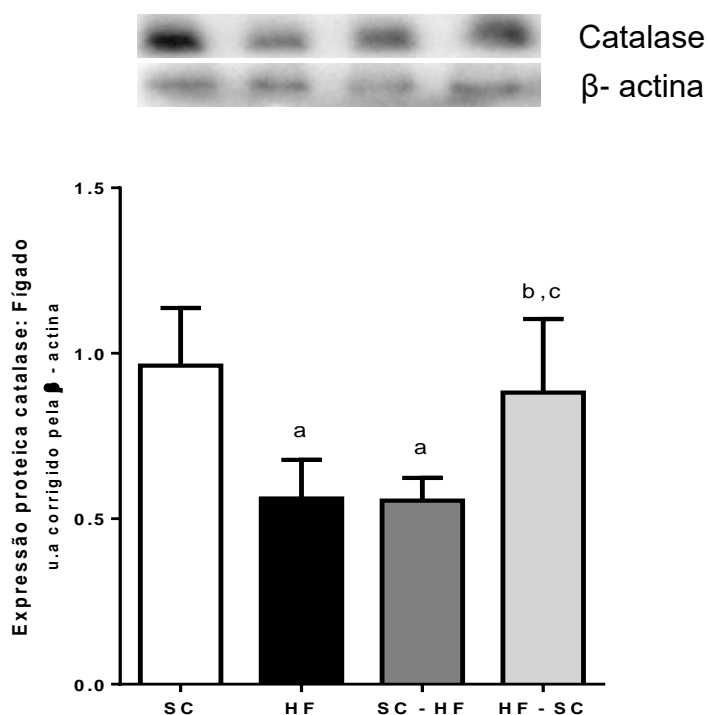
Legenda: Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF ($n=7$ por grupo).
Fonte: A autora, 2014.

7.2 Catalase

7.2.1 Western Blotting

A expressão proteica da enzima catalase se mostrou diminuída nos grupos HF e SC-HF quando estes foram comparados ao grupo SC e ao grupo HF-SC.

Figura 9 – Níveis proteicos de catalase no tecido hepático



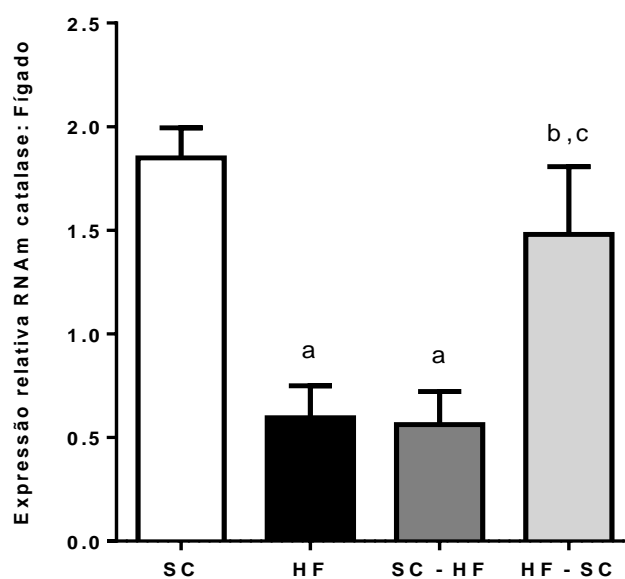
Legenda: Imagens representativas das expressões da catalase e β -actina por western blotting são apresentadas acima do gráfico. Os dados são apresentados em média \pm EPM da razão catalase/ β -actina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.2.2 RT-PCR em tempo real

Os grupos HF e SC – HF apresentaram menores níveis de expressão gênica da catalase quando comparados ao grupo SC. O grupo HF–SC apresentou níveis elevados da expressão da catalase em comparação com os grupos HF e SC–HF e sem diferença em comparação com o grupo SC.

Figura 10 – Expressão gênica da enzima catalase no tecido hepático



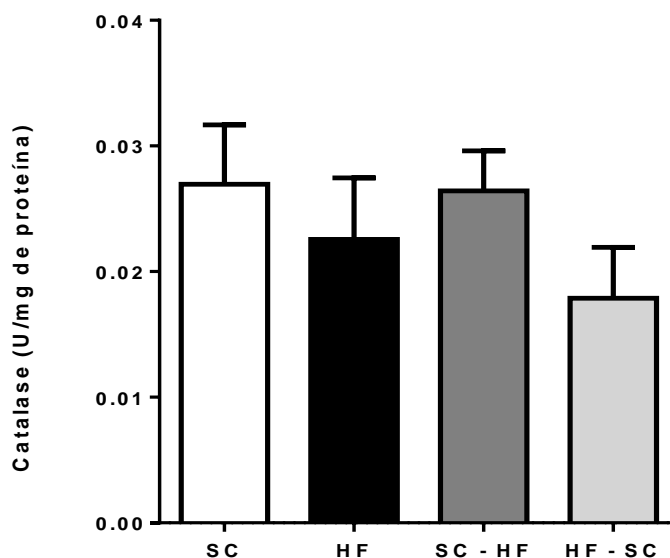
Legenda: Análise realizada por RT-PCR em tempo real do fígado para catalase. Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC- HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.2.3 Atividade enzimática

Em relação à atividade enzimática da catalase, não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais.

Figura 11 – Atividade da enzima catalase no tecido hepático



Legenda: Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-H (n=7 por grupo).

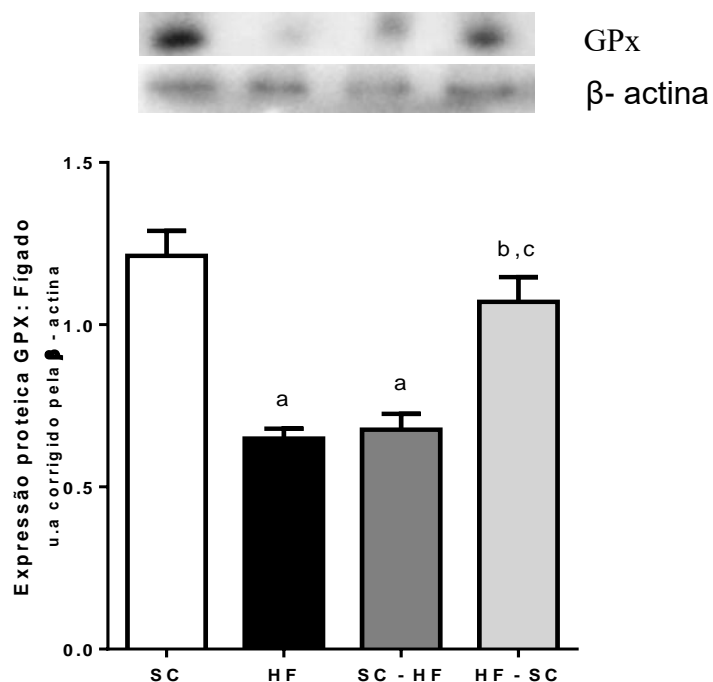
Fonte: A autora, 2014.

7.3 Glutathione Peroxidase (GPX)

7.3.1 Western Blotting

A expressão proteica da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi menor nos animais dos grupos HF e SC–HF. O grupo HF-SC apresentou níveis aumentados da expressão dessa enzima em comparação com os grupos HF e SC–HF e sem diferença estatística em comparação com o grupo SC.

Figura 12 – Níveis proteicos de glutatona peroxidase no tecido hepático



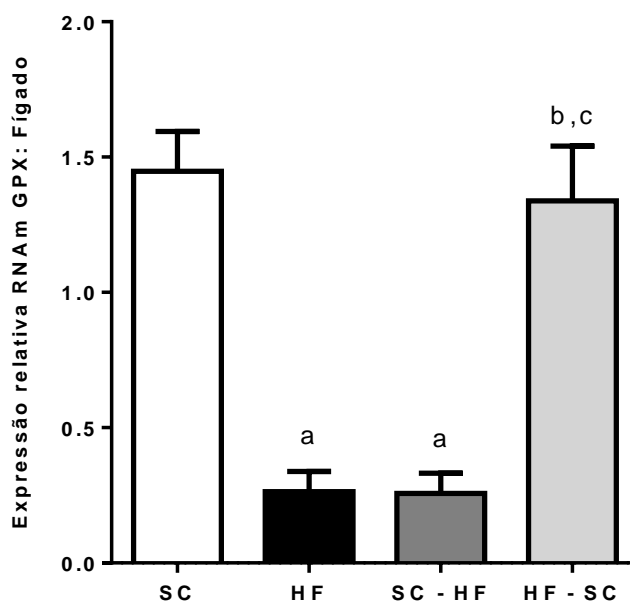
Legenda: Imagens representativas das expressões da GPx e β -actina por western blotting são apresentadas acima do gráfico. Os dados são apresentados em média \pm EPM da razão GPx/ β -actina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.3.2 RT-PCR em tempo real

A expressão gênica da glutatona peroxidase apresentou níveis diminuídos nos grupos HF e SC–HF quando comparados aos grupos SC e HF-SC.

Figura 13 – Expressão gênica da enzima glutatona peroxidase no tecido hepático



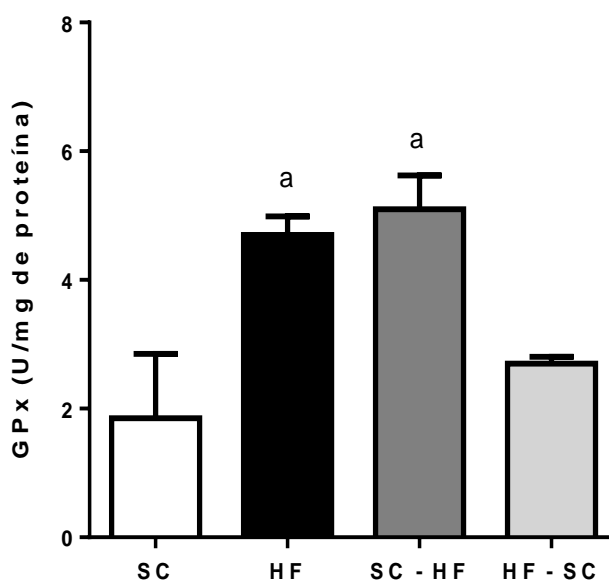
Legenda: Análise realizada por RT-PCR em tempo real do fígado para GPx. Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.3.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática da GPx se mostrou aumentada nos grupos HF e SC-HF em comparação ao grupo SC. O grupo HF-SC não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos.

Figura 14 – Atividade da enzima glutaciona peroxidase no tecido hepático



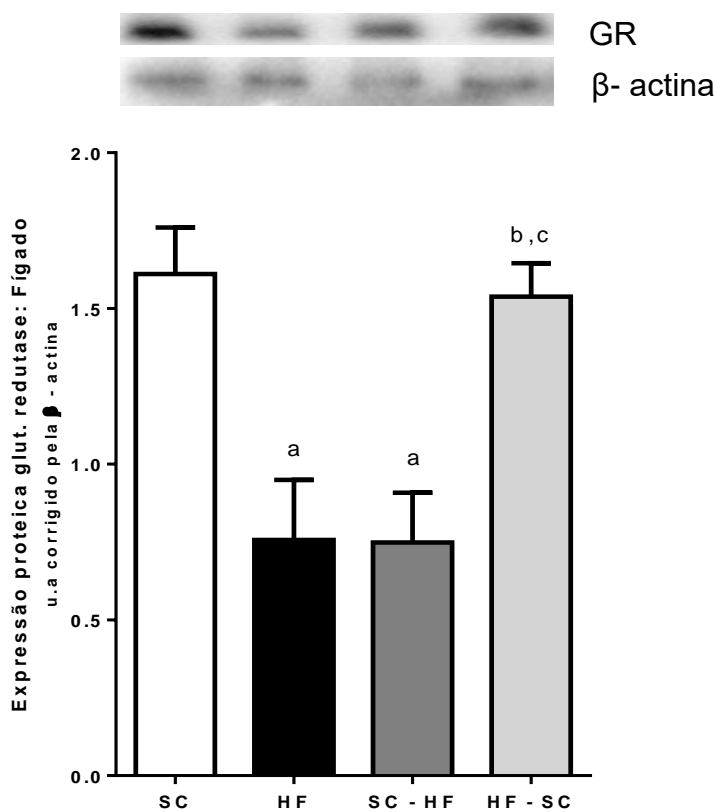
Legenda: Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).
Fonte: A autora, 2014.

7.4 Glutaciona redutase

7.4.1 Western Blotting

A expressão proteica da glutaciona redutase diminuiu nos grupos HF e SC-HF em comparação com o grupo SC. O grupo HF-SC apresentou maior nível da expressão proteica da glutaciona redutase em comparação aos grupos HF e SC-HF, e não apresentou diferença significativa em relação ao grupo SC.

Figura 15 - Níveis proteicos de glutatona redutase no tecido hepático



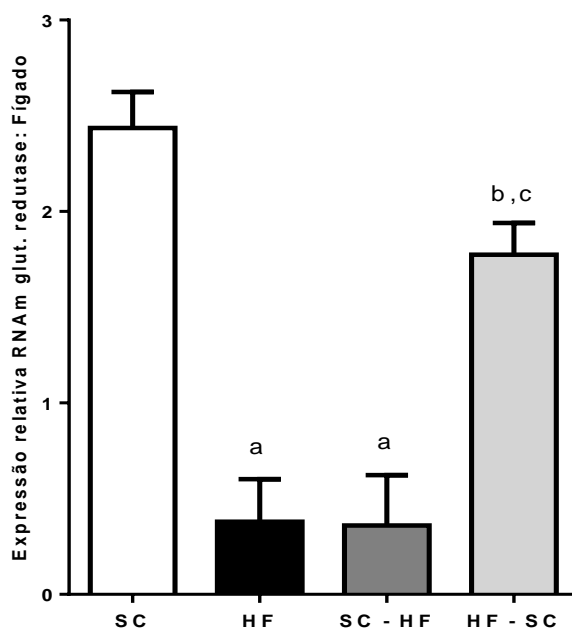
Legenda: Imagens representativas das expressões da glutatona redutase e β -actina por western blotting são apresentadas acima do gráfico. Os dados são apresentados em média \pm EPM da razão glutatona redutase/ β -actina. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p < 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

7.4.2 RT-PCR em tempo real

A expressão gênica da glutatona redutase foi menor nos grupos HF e SC-HF quando comparados ao grupo SC. Os animais do grupo HF-SC mostraram níveis maiores em comparação aos animais do grupo HF e SC-HF. Não houve diferença estatística entre os grupos SC e HF-SC.

Figura 16 - Expressão gênica da enzima glutathiona redutase no tecido hepático



Legenda: Análise realizada por RT-PCR em tempo real do fígado para glutathiona redutase. Dados apresentados como média±EPM. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF e [c] vs grupo SC-HF (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

8 ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO NO TECIDO HEPÁTICO

Em relação ao dano oxidativo de lipídios (TBARs) houve aumento significativo na formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA) no fígado dos animais dos grupos HF e SC–HF quando comparados ao grupo SC. Os animais do grupo HF-SC apresentaram menor produção de MDA quando comparados aos grupos HF e SC–HF. O grupo HF–SC apresentou valores similares aos do grupo SC (SC: $2,7 \pm 0,3$ nmol TBA/ mg proteína; HF: $6,0 \pm 0,7$ nmol TBA/ mg proteína; SC–HF: $5,2 \pm 0,7$ nmol TBA/ mg proteína; HF–SC: $2,8 \pm 0,3$ nmol TBA/ mg proteína).

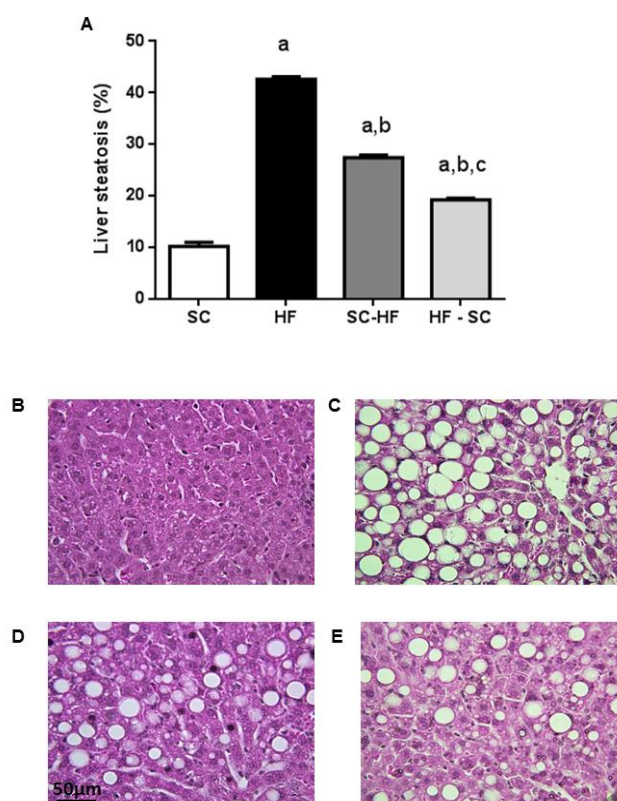
A análise do dano oxidativo de proteínas não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados (SC: $2,9 \pm 1,3$ mol/mg proteína; HF: $2,0 \pm 0,5$ mol/mg proteína; SC–HF: $1,3 \pm 0,3$ mol/mg proteína; HF–SC: $3,3 \pm 0,7$ mol/mg proteína).

9 DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA

A dieta hiperlipídica causou acúmulo de gordura no fígado, com presença de vesículas de lipídeos.

Nota-se que o grupo HF apresentou maior quantidade de esteatose quando comparado aos outros três grupos. Os grupos SC-HF e HF-SC apresentaram maior quantidade de esteatose quando comparado ao grupo SC, porém a esteatose foi menor nesses grupos em comparação com o grupo HF. É possível notar ainda que o grupo HF-SC apresentou menor quantidade de esteatose que o grupo SC-HF.

Figura 17 - Análise de esteatose no fígado



Legenda: (A) Densidade de volume da esteatose em porcentagem estimada nos grupos. Diferenças significativas são representadas pelas letras ($p \leq 0,05$): [a] vs grupo SC, [b] vs grupo HF, [c] vs SC-HF. (B) Grupo SC; (C) Grupo HF; (D) Grupo SC-HF; (E) Grupo HF-SC. Fotomicrografias capturadas em aumento de 40x e coradas com hematoxilina e eosina (n=7 por grupo).

Fonte: A autora, 2014.

10 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da perda de massa corporal em um grupo de animais alimentado inicialmente com dieta hiperlipídica após mudança para dieta controle sobre os parâmetros bioquímicos, marcadores de estresse oxidativo e na estrutura do fígado. Demonstrou-se que uma dieta rica em gorduras durante um período de oito ou dezesseis semanas é capaz de induzir aumento de massa corporal, aumento da gordura intra-abdominal e subcutânea, intolerância à glicose, hipercolesterolemia, esteatose hepática associada à deficiência na expressão gênica e proteica de enzimas antioxidantes, aumento da peroxidação lipídica e da enzima indicadora de dano hepático TGP. Os resultados principais desse estudo demonstram que uma simples redução de massa corporal causa melhorias nos parâmetros acima citados igualando-os em sua maioria, aos valores do grupo SC.

Como esperado, o fornecimento de dieta rica composta por 50% da energia proveniente de lipídeos provocou aumento da massa corporal, como visto no grupo HF e durante o tempo em que esta foi fornecida aos grupos SC-HF e HF-SC. Sua substituição por dieta controle no grupo HF-SC provocou perda de massa corporal. Esse efeito na massa corporal está relacionado com a quantidade de energia presente em cada dieta, uma vez que não foi notada diferença significativa na ingestão alimentar entre os grupos analisados. Nosso estudo corrobora achados na literatura que constataram que, mesmo sem alterar a quantidade diária de ração ingerida, a dieta hiperlipídica promoveu obesidade (Martins et al., 2010, Stranahan et al., 2011, Barbosa-da-Silva et al., 2012, Barbosa-da-Silva et al., 2013).

Os animais do grupo HF apresentaram aumento da reserva de gordura epididimária, retroperitoneal e subcutânea indicando aumento na adiposidade intra-abdominal e no índice de adiposidade como demonstrado previamente por outros estudos (Schrauwen e Westerterp, 2000, Gaiva et al., 2001, Estadella et al., 2004, Barbosa-da-Silva et al., 2012).

O fornecimento de uma dieta hiperlipídica provocou intolerância à glicose no grupo HF que foi revertida após a perda de peso para valores similares aos do grupo SC. O mesmo se repete com os níveis de colesterol, que atingiram os mesmos valores do grupo SC.

Vários estudos mostraram que dietas com alto teor de lipídeos causam alterações metabólicas como hiperglicemia, resistência à insulina e esteatose hepática não alcoólica, como demonstrado nos achados deste presente estudo (Osei-Hyiaman et al., 2008, Fraulob et al., 2010, Barbosa-da-Silva et al., 2012, Barbosa-da-Silva et al., 2013).

Sabe-se que a obesidade acarretada pela ingestão excessiva de lipídeos, se relaciona diretamente com o desenvolvimento de algumas comorbidades e dentre elas a dislipidemia e alterações no perfil glicídico (Schrauwen e Westerterp, 2000, Gauthier et al., 2003, Iossa et al., 2003, Woods et al., 2003, Diniz et al., 2004, Fraulob et al., 2010, Barbosa-da-Silva et al., 2012, Catta-Preta et al., 2012, Fraulob et al., 2012, Barbosa-da-Silva et al., 2013) como foi mostrado no presente estudo, uma vez que a dieta hiperlipídica provocou aumento das concentrações de colesterol assim como alteração no metabolismo dos carboidratos. Esses resultados corroboram a importância da dieta hiperlipídica como um modelo funcional para o desenvolvimento da obesidade e suas conseqüentes alterações.

A diminuição da gordura intra-abdominal se faz importante, uma vez que este tecido tem forte ligação entre as muitas faces da síndrome metabólica como: intolerância à glicose, dislipidemias, resistência insulínica e esteatose hepática não alcoólica (Jequier, 2002, Estadella et al., 2004, Burneiko et al., 2006, Barbosa-da-Silva et al., 2012). Pode-se então associar a perda de massa corporal oriunda da diminuição de gordura intra-abdominal à reversão desses parâmetros encontrados no grupo HF-SC.

Já foi demonstrado que dietas alimentares produzem efeitos que atuam na bioquímica corporal e acúmulo de reservas, modificando morfologicamente vários órgãos. Esse efeito aparece não só em indivíduos adultos, mas também em recém-nascidos de mães cujas dietas foram modificadas (Woods et al., 2003, Catta-Preta et al., 2006, Souza-Mello et al., 2007, Gregorio et al., 2008, Pinheiro et al., 2008, Gregorio et al., 2010, Bringhenti et al., 2011, Frantz et al., 2011, Bringhenti et al., 2013, Gregorio et al., 2013, Magliano et al., 2013, Ornellas et al., 2013). Sabe-se inclusive, que a dieta materna pode modificar a expressão de genes, contribuindo para que o metabolismo desse indivíduo seja modificado (Edozien e Switzer, 1978).

O fígado, através do sistema porta-hepático recebe os produtos oriundos do duodeno que são resultantes do processo de digestão, recebe também produtos da circulação geral através da artéria hepática e do sistema linfático se tornando então,

o principal regulador do fluxo metabólico corporal. A capacidade de captação, especialmente de lipídios, pelos hepatócitos pode ser a principal explicação para o início da esteatose hepática não alcoólica (Bradbury, 2006). O aumento na deposição de gordura no fígado pode ser também oriundo do aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres circulantes (Gauthier et al., 2003). Sendo assim, os resultados reforçam esta teoria, pois os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram acúmulo de gordura no fígado, quando comparados com o grupo SC. Pode-se observar que o grupo onde ocorreu perda de massa corporal, o grupo HF-SC, apresentou significativa diminuição da esteatose hepática, confirmando a premissa de que uma dieta equilibrada, que promova perda de gordura corporal de um indivíduo obeso, já se mostra eficaz na reversão da progressão da doença (Ghaemi et al., 2013, Serviddio et al., 2013) suprimindo a possibilidade do desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica induzida pela dieta hiperlipídica (Gauthier et al., 2003, Burneiko et al., 2006, Barbosa-da-Silva et al., 2012, Barbosa-da-Silva et al., 2013).

Nota-se que o grupo HF apresentou maior quantidade de esteatose do que os outros grupos, com aumento concomitante da enzima celular TGP em relação aos grupos SC-HF e HF-SC. A elevação dos níveis plasmáticos de TGP é considerada um indicador de disfunção hepática, pois, por ser uma enzima intracelular, a sua presença na circulação sistêmica sugere ruptura de hepatócitos, resultantes de necrose, ou alterações na permeabilidade da membrana celular, ou ainda, processo de colestase (Oda et al., 1989).

Ruhl e Everhart em um estudo epidemiológico observaram que 3% da população adulta apresentavam níveis elevados de ALT e notou que em indivíduos com obesidade, a prevalência aumentou para 7%. Foi encontrado ainda esteatose hepática na maioria dos indivíduos com ALT elevada, e isso foi atribuído a um excesso de peso ou obesidade (Ruhl e Everhart, 2003). Em indivíduos com doença hepática alcoólica e doença hepática não alcoólica geralmente ocorre elevação da concentração de ALT sérica (Sass et al., 2005). Tiikkainen e colaboradores relataram que a alteração nas concentrações de ALT no soro se correlaciona diretamente com o acúmulo de gordura hepática (Tiikkainen et al., 2003). No presente estudo, foi demonstrado aumento significativo das concentrações de ALT no grupo HF corroborando com trabalhos prévios que demonstraram níveis de ALT elevados em camundongos depois de alimentados com uma dieta rica em gordura

(Fraulob et al., 2010, Barbosa-da-Silva et al., 2012, Schultz et al., 2012, Barbosa-da-Silva et al., 2013). Observou-se ainda diminuição nos níveis de ALTP no grupo HF-SC atingindo os níveis do grupo controle, o que corrobora com Uslan e colaboradores que relataram que a perda de peso em pessoas obesas com elevados níveis séricos de ALT, faz com que essas concentrações diminuam para valores dentro dos limites normais (Uslan et al., 2007).

Estudos têm comprovado que alterações no estado redox celular estão diretamente relacionadas com a obesidade e a esteatose hepática não alcoólica em humanos e animais (Furukawa et al., 2004, Carmiel-Haggai et al., 2005, Stefanovic et al., 2008, Noeman et al., 2011, Kumar et al., 2013), e que a redução da massa corporal é um importante agente na regulação de mediadores bioquímicos e moleculares durante esse processo (Carmiel-Haggai et al., 2005, Elizondo et al., 2008).

Vários estudos têm destacado a importância do estresse oxidativo na patogênese da obesidade. Um estudo clínico (Hansel et al., 2004) comparou 10 indivíduos obesos com 11 indivíduos controle e os resultados mostraram que os indivíduos obesos apresentaram marcadores de lipoperoxidação, indicativo de dano em lipídeos, quatro vezes maior que os valores do grupo controle, assim como foi avaliado nesse presente estudo onde foi observado alto grau de dano lipídico no grupo HF e no grupo SC-HF. Ainda no estudo clínico de Hansel e colaboradores ao avaliar as subunidades do HDL, foi identificada correlação inversa entre a atividade antioxidante do HDL com resistência à insulina e a atividade da enzima para-oxanase (enzima que protege a oxidação do HDL). Deve-se destacar que o HDL é considerado um potente antioxidante conforme demonstrado por estudos *in vitro* (Kunitake et al., 1992) e *ex-vivo* (Klimov et al., 1993). O HDL impede a oxidação do LDL e, portanto é potente inibidor da formação de células espumosas, envolvidas na formação da placa de ateroma. Voluntários aparentemente saudáveis com idade média de 56 anos apresentaram correlação positiva entre índice de massa corpórea (IMC) e lipoperoxidação plasmática, fato também observado no nosso estudo, principalmente ao se analisar o grupo HF-SC que apresentou reversão dos valores de lipoperoxidação.

Após esses resultados em humanos, Hansel e colaboradores avaliaram os possíveis mecanismos pelos quais o estresse oxidativo ocorre na obesidade utilizando camundongos geneticamente obesos (Furukawa et al., 2004, Hansel et al.,

2011). Os resultados mostraram que, em relação ao grupo obeso não diabético, o tecido adiposo do grupo obeso-diabético apresentou diminuição de enzimas antioxidantes (catalase, SOD, GPx), aumento das EROs e da expressão gênica da NADPH-oxidase. Ainda foi observado que a suplementação com antioxidante (vitaminas A e E) apresentou melhora de parâmetros plasmáticos (glicemia, insulina, triglicerídeos) e redução da esteatose hepática. O conjunto de resultados sugere que a ocorrência do estresse oxidativo é um fato precoce desencadeado pela obesidade e que o seu perfeito entendimento é um alvo terapêutico potencialmente útil na obesidade.

Como observado no presente estudo, houve diminuição da expressão gênica e proteica das enzimas antioxidantes sendo estas, SOD, catalase, GPx e glutathione redutase, porém diferente do estudo de Hensel e colaboradores, essa mensuração foi feita no tecido hepático e não no tecido adiposo.

Acredita-se que a redução da expressão destas enzimas nos grupos HF e SC-HF se devam ao fato de que as próprias espécies reativas de oxigênio, estejam causando algum tipo de dano a nível molecular nessas enzimas. Mais estudos são necessários para se entender a fundo como se dão essas alterações em níveis moleculares, mas o que podemos afirmar é que a diminuição da massa corporal por si só, já é capaz de recuperar a saúde, garantindo ao indivíduo melhora na qualidade de vida (Babraj et al., 2009).

A redução da expressão gênica e proteica das enzimas antioxidantes pode ser devido ao consumo rápido e exaustão do armazenamento desta enzima no combate a radicais livres gerados durante o desenvolvimento da obesidade (Noeman et al., 2011).

A diminuição da enzima catalase pode conduzir a um desequilíbrio redox e promover acúmulo de peróxido hidrogênio e reagir com metais de transição, gerando radical hidroxila, que é o radical mais deletério às biomoléculas.

Paradoxalmente, a atividade das enzimas SOD e CAT permaneceu inalterada enquanto que houve aumento da atividade da enzima GPx nos grupos HF e SC-HF, provavelmente por haver maior biodisponibilidade desse substrato. Um estudo dosando a concentração disponível desse substrato seria o recomendado.

Tem sido relatado que a superprodução de adipocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β , e IL-6 tenham papel na relação entre obesidade e indução de estresse oxidativo (Esposito et al., 2006, Yamashita et al., 2010). Em contraste, a

gordura corporal é inversamente proporcional à defesa antioxidante (Chrysohoou et al., 2007, Hartwich et al., 2007). Os nossos achados estão de acordo com aqueles observados em outros estudos, os quais demonstram que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e baixos níveis de enzimas antioxidantes (Morrow, 2003, Stadtman e Levine, 2003, Shevalye et al., 2012).

Portanto, a novidade do presente estudo é a comprovação de que a perda de massa corporal, sem auxílio de medicamentos e apenas com dieta com menor teor de lipídeos, consegue reverter todos os malefícios característicos da obesidade.

CONCLUSÃO

Animais C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem características da doença hepática gordurosa não alcoólica, uma condição que está intimamente relacionado com a obesidade uma vez que o acúmulo de gordura no fígado é um sintoma bem conhecido decorrente desta enfermidade.

Pode-se concluir, com base nos resultados do estudo, que a perda da massa corporal induzida pela troca de dieta hiperlipídica por dieta com teor normal de lipídeos atenua a esteatose hepática, melhora o perfil lipídico e glicídico e reverte as alterações das enzimas antioxidantes e a função hepática. Esses resultados reforçam os benefícios da adoção de estratégias não farmacológicas para o controle da obesidade.

REFERÊNCIAS

- Abbate-Daga G, Delsedime N, Nicotra B, Giovannone C, Marzola E, Amianto F, Fassino S. Psychosomatic syndromes and anorexia nervosa. *BMC Psychiatry* 2013; 13: 14.
- Acharya J, PUNCHARD NA, Taylor JA, Thompson RP, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 1991; 47: 287-291.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
- Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 55: 187-195.
- Aguila MB, Pinheiro AR, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23: 363-370.
- Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 304- 310.
- Amato MC, Giordano C. Visceral adiposity index: An indicator of adipose tissue dysfunction. *Int J Endocrinol* 2014; 2014:1-7
- Babraj JA, Vollaard NB, Keast C, Guppy FM, Cottrell G, Timmons JA. Extremely short duration high intensity interval training substantially improves insulin action in young healthy males. *BMC Endocr Disord* 2009; 9: 3.
- Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: A multicenter retrospective study. *J Pediatr* 1995; 127: 700-704.
- Baraibar MA, Liu L, Ahmed EK, Friguet B. Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 919832.
- Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *Am Pharm* 1994; 34: 26-35.
- Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res* 2013; 44: 450-459.
- Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS one* 2012; 7: 1-15.
- Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RdCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Oxidative stress: Concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr* 2010; 23: 629-643.

Barnes J, Stein A, Smith T, Pollock JI. Extreme attitudes to body shape, social and psychological factors and a reluctance to breast feed. Alspac study team. Avon longitudinal study of pregnancy and childhood. *J R Soc Med* 1997; 90: 551-559.

Blackburn GL, Wilson GT, Kanders BS, Stein LJ, Lavin PT, Adler J, Brownell KD. Weight cycling: The experience of human dieters. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 1105-1109.

Bonnes-Taourel D, Guerin MC, Torreilles J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 985-988.

Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: Possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: 194-198.

Bringhenti I, Moraes-Teixeira JA, Cunha MR, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. *PLoS one* 2013; 8: 1-11.

Bringhenti I, Schultz A, Rachid T, Bomfim MA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 1009-1014.

Brown PJ. Culture and the evolution of obesity. *Human nature* 1991; 2: 31-57.

Burneiko RC, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GM, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli EL. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1167-1172.

Carmiel-Haggai M, Fiel MI, Gaddipati HC, Abittan C, Hossain S, Roayaie S, Schwartz ME, Gondolesi G, Emre S, Schiano TD. Recurrent hepatitis c after retransplantation: Factors affecting graft and patient outcome. *Liver Transpl* 2005; 11: 1567-1573.

Catala A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "fluid mosaic model" to the "lipid whisker model". *Biochimie* 2012; 94: 101-109.

Catta-Preta M, Martins MA, Cunha Brunini TM, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in c57bl/6 mice by different high-fat diets. *Nutrition* 2012; 28: 212-219.

Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci* 2006; 80: 219-229.

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Economou M, Papadimitriou L, Stefanadis C. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: The attica study. *Atherosclerosis* 2007; 192: 169-176.

de la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. Insulin resistance and neurodegeneration: Roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 1049-1060.

De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: Role of p66shc and protein kinase c. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 1-11.

Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 118-126.

Diehl AM. Alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* 1998; 2: 103-118.

Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: Oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 313-319.

Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 1990; 20: 901-907.

Edozien JC, Switzer BR. Influence of diet on growth in the rat. *J Nutr* 1978; 108: 282-290.

Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension* 2003; 41: 1072-1079.

Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Signorini C, Sgherri C, Comporti M, Poniachik J, Videla LA. Effects of weight loss on liver and erythrocyte polyunsaturated fatty acid pattern and oxidative stress status in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Res* 2008; 41: 59-68.

Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Mediterranean diet, endothelial function and vascular inflammatory markers. *Public Health Nutr* 2006; 9: 1073-1076.

Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004; 20: 218-224.

Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: Clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5: 27-42.

Field AE, Malspeis S, Willett WC. Weight cycling and mortality among middle-aged or older women. *Arch Intern Med* 2009; 169: 881-886.

Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among us adults, 1999-2010. *JAMA* 2012; 307: 491-497.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121.

- Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132: 110-116.
- Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, Boucher JL, Histon T, Caplan W, Bowman JD, Pronk NP. Weight-loss outcomes: A systematic review and meta-analysis of weight-loss clinical trials with a minimum 1-year follow-up. *J Am Diet Assoc* 2007; 107: 1755-1767.
- Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: Insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (nafpd) in c57bl/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223.
- Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123: 259-270.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (o₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-18517.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114: 1752-1761.
- Gaiva MH, Couto RC, Oyama LM, Couto GE, Silveira VL, Riberio EB, Nascimento CM. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: Effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr* 2001; 86: 371-377.
- Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol (1985)* 2003; 94: 2127-2134.
- Ghaemi A, Taleban FA, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z, Homayounfar R, Fakheri H. How much weight loss is effective on nonalcoholic fatty liver disease? *Hepat Mon* 2013; 13: 1-9.
- Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in c57bl/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 491-498.
- Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal fish oil supplementation benefits programmed offspring from rat dams fed low-protein diet. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 81-87.
- Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr* 2013; 52: 759-769.
- Gurevich-Panigrahi T, Panigrahi S, Wiechec E, Los M. Obesity: Pathophysiology and clinical management. *Curr Med Chem* 2009; 16: 506-521.

Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: Oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 1023-1027.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1147-1150.

Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4963-4971.

Hansel B, Girerd X, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Chantepie S, Orsoni A, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Blood pressure-lowering response to amlodipine as a determinant of the antioxidative activity of small, dense hdl3. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011; 11: 317-325.

Hartwich J, Goralska J, Siedlecka D, Gruca A, Trzos M, Dembinska-Kiec A. Effect of supplementation with vitamin e and c on plasma hscrp level and cobalt-albumin binding score as markers of plasma oxidative stress in obesity. *Genes Nutr* 2007; 2: 151-154.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-1209.

Heaner MK, Walsh BT. A history of the identification of the characteristic eating disturbances of bulimia nervosa, binge eating disorder and anorexia nervosa. *Appetite* 2013; 71: 445-448.

Heikal AH, Badawy O, Hafez AM, City S. Genetic relationships among some stevia (*stevia rebaudiana bertonii*) accessions based on issr analysis. *Research Journal of Cell and Molecular Biology* 2008; 2: 1-5.

Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: A direct link to cvd? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 365-367.

Holt R. The food and agriculture organization/world health organization expert report on diet, nutrition and prevention of chronic diseases. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5: 354.

Huneault L, Mathieu ME, Tremblay A. Globalization and modernization: An obesogenic combination. *Obes Rev* 2011; 12: 64-72.

Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4058-4065.

Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* 2003; 90: 953-960.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.

Jequier E. Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26 Suppl 2: S12-17.

Jialal I, Grundy SM. Influence of antioxidant vitamins on ldl oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 237-247.

Johansson K, Neovius M, Hemmingsson E. Effects of anti-obesity drugs, diet, and exercise on weight-loss maintenance after a very-low-calorie diet or low-calorie diet: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2014; 99: 14-23.

Kaushik R, Narayanan P, Vasudevan V, Muthukumaran G, Usha A. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J Food Sci Technol* 2010; 47: 27-33.

Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993; 100: 13-18.

Kojo S. Vitamin c: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1041-1064.

Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 61-66.

Kumar M, Rastogi A, Singh T, Behari C, Gupta E, Garg H, Kumar R, Bhatia V, Sarin SK. Controlled attenuation parameter for non-invasive assessment of hepatic steatosis: Does etiology affect performance? *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1194-1201.

Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein a-i-containing plasma lipoproteins: Inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6993-6997.

Lacraz G, Figeac F, Movassat J, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Leloup C, Bailbe D, Homo-Delarche F, Portha B. Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses. *PLoS one* 2009; 4: 1-13.

Lankford T, Lang J, Bowden B, Baun W. Workplace health: Engaging business leaders to combat obesity. *J Law Med Ethics* 2013; 41 Suppl 2: 40-45.

Lavine JE. Vitamin e treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 2000; 136: 734-738.

Lawrence M. The psychopathology of anorexia nervosa. *In J Psychoanal* 1999; 80: 604-606.

Lee HO, Yim JE, Kim YS, Choue R. Moderate diet-induced weight loss is associated with improved insulin sensitivity in middle-aged healthy obese Korean women. *Nut Res Pract* 2014; 8: 469-475.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438.

Luyckx FH, Scheen AJ, Desai C, Thiry A, Lefebvre PJ. Parallel reversibility of biological markers of the metabolic syndrome and liver steatosis after gastroplasty-induced weight loss in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4293.

Ma Y, Pagoto SL, Griffith JA, Merriam PA, Ockene IS, Hafner AR, Olendzki BC. A dietary quality comparison of popular weight-loss plans. *J Am Diet Assoc* 2007; 107: 1786-1791.

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PloS one* 2013; 8: 1-12.

Martinez G, Jodar E, Hawkins F. Physiopathologic basis of obesity. *Aten Primaria* 2000; 25: 425-431.

Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TC, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from c57bl/6 mice. *Arch Biochem Biophys* 2010; 499: 56-61.

McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 52.

McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr* 2002; 21: 1-13.

Mello Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem J* 1984; 218: 273-275.

Merry TL, Tran M, Stathopoulos M, Wiede F, Fam BC, Dodd GT, Clarke I, Watt MJ, Andrikopoulos S, Tiganis T. High-fat-fed obese glutathione peroxidase 1-deficient mice exhibit defective insulin secretion but protection from hepatic steatosis and liver damage. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 2114-2129.

Moran JR, Ghishan FK, Halter SA, Greene HL. Steatohepatitis in obese children: A cause of chronic liver dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1983; 78: 374-377.

Morgen CS, Sorensen TI. Obesity: Global trends in the prevalence of overweight and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2014: 1-2.

Morrow JD. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; 23: 368-370.

Nelson TF, Gortmaker SL, Subramanian SV, Cheung L, Wechsler H. Disparities in overweight and obesity among us college students. *Am J Health Behav* 2007; 31: 363-373.

Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: An evolving diagnosis. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 321-326.

Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis. *Med Clin North Am* 1996; 80: 1147-1166.

Nobili V, Alisi A, Della Corte C, Rise P, Galli C, Agostoni C, Bedogni G. Docosahexaenoic acid for the treatment of fatty liver: Randomised controlled trial in children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 1066-1070.

Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr* 2011; 3: 17.

Oda M, Azuma T, Nishizaki Y, Kaneko K, Komatsu H, Tsukada N, Watanabe N, Nakamura M, Tsuchiya M. Alterations of hepatic sinusoids in liver cirrhosis: Their involvement in the pathogenesis of portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 1989; 4 Suppl 1: 111-113.

Ornellas F, Mello VS, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers. *Life Sci* 2013; 93: 454-463.

Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Batkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. Hepatic cb1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3160-3169.

Palekar NA, Naus R, Larson SP, Ward J, Harrison SA. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 151-156.

Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clin Nutr* 2007; 26: 409-415.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S170-180.

Parker M, Schinina M, Bossa F, Bannister J. Chemical aspects of the structure, function and evolution of superoxide dismutases. *Inorganica Chimica Acta* 1984; 91: 307-317.

Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 381-392.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the 1997 American Heart Association scientific statement on obesity and heart disease from the obesity committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 113: 898-918.

Portha B, Giroix MH, Serradas P, Morin L, Saulnier C, Bailbe D. Glucose refractoriness of pancreatic beta-cells in rat models of non-insulin dependent diabetes. *Diabetes Metab* 1994; 20: 108-115.

- Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 48-53.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951.
- Rendo-Urteaga T, Puchau B, Chueca M, Oyarzabal M, Azcona-Sanjulian MC, Martinez JA, Marti A. Total antioxidant capacity and oxidative stress after a 10-week dietary intervention program in obese children. *Eur J Pediatr* 2014; 173: 609-616.
- Roberts EA. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 155-172.
- Romero CEM, Zanesco A. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. *Rev Nut* 2006; 19: 85-91.
- Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003; 124: 71-79.
- Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: A clinical review. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 171-180.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26: 57-60.
- Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 2000; 84: 417-427.
- Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64: 273-282.
- Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: Learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 952-968.
- Sharma M, Branscum P. Novel and emerging approaches to combat adolescent obesity. *Adolescent health, medicine and therapeutics* 2010; 1: 9-19.
- Shehzad A, Khan S, Sup Lee Y. Curcumin molecular targets in obesity and obesity-related cancers. *Future Oncol* 2012; 8: 179-190.
- Shevalye H, Lupachyk S, Watcho P, Stavniichuk R, Khazim K, Abboud HE, Obrosova IG. Prediabetic nephropathy as an early consequence of the high-calorie/high-fat diet: Relation to oxidative stress. *Endocrinology* 2012; 153: 1152-1161.
- Sjöström CD, Lissner L, Wedel H, Sjöström L. Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: The SOS intervention study. *Obes Res* 1999; 7: 477-484.

Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *Br J Nutr* 2007; 98: 1159-1169.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-218.

Stefanovic A, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Bogavac-Stanojevic N, Bujisic N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79: 156-163.

Stranahan AM, Cutler RG, Button C, Telljohann R, Mattson MP. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. *J Neurochem* 2011; 118: 611-615.

Taing KY, Ardern CI, Kuk JL. Effect of the timing of weight cycling during adulthood on mortality risk in overweight and obese postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 407-413.

Tiikkainen M, Bergholm R, Vehkavaara S, Rissanen A, Hakkinen AM, Tamminen M, Teramo K, Yki-Jarvinen H. Effects of identical weight loss on body composition and features of insulin resistance in obese women with high and low liver fat content. *Diabetes* 2003; 52: 701-707.

Tominaga K, Kurata JH, Chen YK, Fujimoto E, Miyagawa S, Abe I, Kusano Y. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2002-2009.

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 339-352.

Troisi RJ, Weiss ST, Segal MR, Cassano PA, Vokonas PS, Landsberg L. The relationship of body fat distribution to blood pressure in normotensive men: The normative aging study. *Int J Obes* 1990; 14: 515-525.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: The stepanizer. *J Microsc* 2011; 243: 47-59.

Uslan I, Acarturk G, Karaca E, Albayrak R, Yuksel S, Colbay M, Karaman O, Akcan Y. The effects of weight loss on normal transaminase levels in obese patients. *Am J Med Sci* 2007; 334: 327-330.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

Vaziri ND, Lee YS, Lin CY, Lin VW, Sindhu RK. Nad(p)h oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. *Brain Res* 2004; 995: 76-83.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 400-418.

- West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 1992; 262: 1025-1032.
- West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: Lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 505-512.
- Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 3: S215-219.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003; 133: 1081-1087.
- Yamashita AS, Lira FS, Rosa JC, Paulino EC, Brum PC, Negrao CE, dos Santos RV, Batista ML, Jr., do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M. Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: The effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine* 2010; 52: 168-174.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.

ANEXO A - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/033/2011 sobre "Efeitos de diferentes concentrações de óleo de peixe sobre parâmetros cardiovasculares e metabólicos", sob a responsabilidade de **Antônio Claudio Mendes Ribeiro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **14/07/2011**. Este certificado expira em **14/07/2015**.

Rio de Janeiro, 14 de Julho de 2011.



Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8*





Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

*Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2887-8*

/ass

ANEXO B - Submissão do artigo

The Journal of Nutritional Biochemistry







Contact us  Help ?  'My EES Hub' available for consolidated users ... [more](#)

home | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: TBrunini-568 Switch To:

Version: [EES_2014.5](#)

Submissions Being Processed for Author Tatiana Brunini

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		BODY MASS REDUCTION RESTORES ANTIOXIDANT DEFENSE IN LIVER FROM C57BL/6 MICE FED HIGH-FAT DIET	Aug 08, 2014	Aug 08, 2014	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

<< Author Main Menu