



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA -
PPGQB

ORLANDO ROBERTO PIMENTEL DE ARAÚJO

ANÁLISE DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A DIFERENTES
MODELOS DIETÉTICOS INDUTORES DA DOENÇA DO FÍGADO
GORDUROSO NÃO ALCOÓLICA

Maceió-AL

2014

ORLANDO ROBERTO PIMENTEL DE ARAÚJO

**ANÁLISE DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM AMOSTRAS
BIOLÓGICAS DE RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A DIFERENTES
MODELOS DIETÉTICOS INDUTORES DA DOENÇA DO FÍGADO
GORDUROSO NÃO ALCOÓLICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Química e Biotecnologia como
requisito necessário para a obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca
Goulart

Coorientadora: Iara Barros Valentim

Maceió-AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

A663a Araújo, Orlando Roberto Pimentel de.
Análise de marcadores de estresse oxidativo em amostras biológicas de ratos wistar submetidos a diferentes modelos dietéticos indutores da Doença do fígado gorduroso não alcoólica / Orlando Roberto Pimentel de Araújo . – 2014.
85 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Coorientadora: Iara Barros Valentim.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 81-85.

1. Espécie reativa de oxigênio. 2. Espécie reativa de nitrogênio.
3. Estresse oxidativo. 3. Fígado gorduroso. 4. Dano hepatocelular.
5. Biomarcadores. 5. Antioxidantes. 6. Dietas. I. Título.

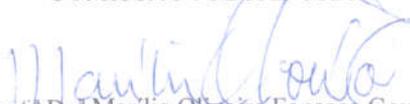
CDU: 542.06:612.351



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da defesa de Dissertação do mestrando **Orlando Roberto Pimentel de Araújo**, intitulada: **“Análise de Marcadores de Estresse Oxidativo em Amostras Biológicas de Ratos Wistar Submetidos a Diferentes Modelos Dietéticos Indutores da Doença do Fígado Gorduroso Não Alcoólica”**, apresentada ao PPGQB/UFAL em 17 de fevereiro de 2014, as 09:00 h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientador - PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a Dr.^a Iara Barros Valentim
Coorientador - IFAL/Maceió


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a Dr.^a Janaina Heberle Bortoluzzi
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a Dr.^a Sandra Mary Lima Vasconcelos
PPGQB/IQB/UFAL

Dedico este trabalho a:

- A minha ex-orientadora Denise Maria Pinheiro (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Nara Francisca Pimentel, que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À professora Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

A todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia, pelo convívio, apoio, compreensão e amizade.

Aos amigos Juliana Célia de Farias, Iara Gomes Valentim, Kívia de Andrade, John Marques, Fabiana Moura por toda a ajuda e paciência durante esse período de elaboração da dissertação, quando foram imprescindíveis tanto para o trabalho como pela amizade.

Aos professores Emiliano, Salete, Daniel, Euzébio, Luiza e Edson pelo auxílio com equipamentos e reagentes, quando necessário.

Aos amigos e colegas tanto do laboratório de eletroquímica como do IQB, pelo incentivo e apoio constantes.

Aos meus grandes amigos Aída, Deyse, Fabrício, Adeildo, Priscila, Aldir, Willian e Elisiel por tudo, pois sem a amizade deles nos momentos mais difíceis seria tortuosa a minha chegada até aqui.

*“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor
ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas
para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”*

Érico Veríssimo

RESUMO

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tem estreita relação com o desenvolvimento da doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA). Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese do dano hepatocelular e esteato-hepatite. A utilização de modelos animais permite melhor entendimento de sua fisiopatologia e sua evolução para as fases mais avançadas da doença. Além disso, possibilita o estudo dos mecanismos de ação de várias terapêuticas disponíveis para seu tratamento. O objetivo do trabalho em questão foi avaliar o estresse oxidativo em extrato hepático e soro sanguíneo de ratos Wistar submetidos a diferentes modelos dietéticos indutores da doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA). Quarenta ratos machos *Wistar*, após 21 dias de desmame, foram submetidos a modelos dietéticos a partir da formulação AIN-93 (padrão-Pad) para indução da DFGNA: deficiente em colina (DC – esteatose moderada), deficiente em colina e cistina (DCC – esteatose grave) e AIN-93 (esteatose leve) sendo comparados a um grupo controle (Cont– sem esteatose) (dieta comercial *Nuvilab*®). O estresse oxidativo (EO) foi avaliado por meio de análise da peroxidação lipídica (TBARS), de proteínas carboniladas, de tióis totais, da atividade da catalase e da ação sequestrante frente ao radical DPPH. Analisou-se em conjunto a histologia do tecido hepático para comparação entre os possíveis danos causados. A estatística foi realizada e foi assumida a significância de 5%. Observou-se que os grupos DC e DCC tiveram comportamento similar quanto à peroxidação lipídica e maiores valores em comparação ao Conte Pad ($p < 0,001$) e dano oxidativo em proteínas, apresentando resultados superiores nesses mesmos grupos, em relação ao Cont ($p < 0,005$). Observou-se em relação à defesa antioxidante, valores semelhantes em catalase, SOD e tióis totais, com resultados inferiores nos grupos mais deficientes, demonstrando dano oxidativo importante em animais com DFGNA, independente do grau de esteatose.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estresse oxidativo. Dano hepatocelular. Biomarcadores do estresse oxidativo. Antioxidantes. Dietas.

ABSTRACT

The increased production of reactive oxygen species (ROS) is closely related to the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Several experimental models have been used to elucidate the mechanisms involved in the pathogenesis of hepatic steatosis and steatohepatitis. The use of animal models allows a better understanding of their pathophysiology and progression to more advanced stages of the disease. In addition, it allows the study of the mechanisms of action of various therapies available for their treatment. The objective of the present work was to evaluate the oxidative stress in liver extract and blood serum of rats subjected to different dietary patterns, inductor of the non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The animals (forty male Wistar rats with 21 days) were divided, according to the dietary groups, as: standard (Pad); deficient in choline (DC); deficient in choline and cystine (DCC) and control (Cont). Redox imbalance assays were performed to evaluate liver tissue and blood serum by analysis of lipid peroxidation (TBARS), carbonylated proteins, total thiols, activity of superoxide dismutase, of catalase and DPPH Scavenging Activity, together with histopathological analysis of liver tissues, for comparison of possible oxidative damage. Statistical analysis was performed using the Tukey test, assuming a significance level of 5%. It was observed that the DC and DCC groups had similar behavior in relation to lipid peroxidation, TBARS, presenting higher levels in comparison to Cont and Pad ($p < 0.001$); oxidative damage in proteins presenting similar results as Pad, but higher than Cont ($p < 0.005$). It was observed that the antioxidant defense levels were similar in catalase, SOD and total thiols, with lower results in deficient groups, evidencing an important oxidative damage in animals with DFGNA, regardless of the degree of steatosis.

Keywords: Reactive oxygen and nitrogen species. Oxidative stress. Hepatic damage. Biomarkers of oxidative stress. Antioxidants. Diets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura da fosfatidilcolina, que reveste a lipoproteína de baixa densidade.	22
Figura 2	– Etapas de propagação e de terminação da lipoperoxidação e ação antioxidante do α -tocoferol em membranas celulares.	30
Figura 3	– Esquema geral da peroxidação lipídica segundo Halliwell, 2000.	32
Figura 4	– Principais métodos de avaliação do estresse oxidativo.	35
Figura 5	– Produtos da reação das EROs sobre diferentes substratos com geração de produtos oxidados em macromoléculas.	36
Figura 6	– Reação de redução do radical DPPH, quando este abstrai um átomo de hidrogênio do meio protetor (antioxidante), representado por BHT, reduzido a 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPHH).	38
Figura 7	– Reação entre malonaldeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) com formação de um cromógeno que apresenta uma coloração rósea intensa em um comprimento de onda de 532nm.	39
Figura 8	– Reação entre grupamentos carbonílicos com 2,4-dinitrofenil-hidrazina para formação de 2,4-difenil-hidrazona e água.	40
Figura 9	– Reação entre glutathiona reduzida (GSH) com ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) para a formação de um aduto de glutathiona-ácido-2-nitro-5-mercapto-benzóico (GSTNB) e ácido-2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB).	42
Figura 10	– Diagrama do delineamento experimental.	45
Figura 11	– Via metabólica da Metionina.	47
Figura 12	– Sacrifício dos animais no trigésimo (30 ^o) dia de experimento	49
Figura 13	– Fluxograma experimental do tratamento dado ao tecido hepático para realização das análises do perfil redox.	50
Figura 14	– Fluxograma do tratamento do sangue, após o sacrifício até a análise da atividade antioxidante total.	51
Figura 15	– Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo Padrão AIN 93. Aumento 20x.	60
Figura 16	– Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo Padrão AIN 93. Aumento 30x.	61
Figura 17	– Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo deficiente em colina AIN 93. Aumento 20x.	62
Figura 18	– Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo deficiente em colina e cistina AIN 93. Aumento 20x.	63
Figura 19	– Concentração de proteína em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).	66

Figura 20	– Percentual de descoramento do DPPH em soro nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).	67
Figura 21	– Percentual de descoramento do DPPH em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).	69
Figura 22	– Concentração de TBARS em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.	70
Figura 23	– Concentração de proteínas carboniladas em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.	72
Figura 24	– Concentração de catalase em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.	74
Figura 25	– Concentração de SOD em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).	75
Figura 26	– Concentração de tiois totais em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Espécies reativas de oxigênio, tempos de meia vida e algumas características.	25
Tabela 2	– Identificação dos antioxidantes e respectivas funções: segundo obtenção e atuação.	28
Tabela 3	– Composição da dieta comercial Nuvilab®	44
Tabela 4	– Composição da dieta AIN-93 nas versões Padrão (Pad), Deficiente em Colina (DC) e Deficiente em Colina e Cistina (DCC).	46
Tabela 5	– Peso corporal final (PCF), peso absoluto do fígado (PAF) e peso relativo do fígado (PRF), nos diferentes modelos dietéticos.	64
Tabela 6	– Descrição estatística do DPPH do soro hepático nos diferentes grupos.	67
Tabela 7	– Descrição estatística do DPPH do extrato hepático nos diferentes grupos.	69
Tabela 8	– Descrição estatística de TBARS do extrato hepático nos diferentes grupos.	70
Tabela 9	– Descrição estatística das proteínas carboniladas do extrato hepático nos diferentes grupos.	72
Tabela10	– Descrição estatística da catalase do extrato hepático nos diferentes grupos.	74
Tabela11	– Descrição estatística da superóxido dismutase do extrato hepático nos diferentes grupos.	75
Tabela12	– Descrição estatística de tiois totais do extrato hepático nos diferentes grupos.	77
Tabela13	– DPPH do extrato hepático com os biomarcadores do desequilíbrio redox, segundo o grupo de tratamento.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
AGL	Acido graxo livre
AGPI	Acido graxo poli-insaturado
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
Asc-	Ascorbato
Asc•	Ânion radical semidesidroascorbato
AscH ⁻	Ânion ascorbato
AsCH ₂	Ácido ascórbico
ATC	Acido tricloroacético
CAT	Catalase
CONT	Controle
BHT	Di-terc-butil metil fenol
DC	Deficiente em colina
DCC	Deficiente em colina e cistina
DCM	Deficiente em colina e metionina
DFGNA	Doença do fígado gorduroso não alcoólica
DHC	Dano hepatocelular
DHNA	Doença hepática não alcoólica
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPHH	2,2-Difenil-picril-hidrazina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
EO	Estresse oxidativo
ER	Espécie reativa
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Fosfatidilcolina

GPx	Glutationaperoxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
TNB	Ácido-2-nitro-5-mercaptobenzóico
HVC	Hepatite viral crônica
IKK β	Inibidora da quinase Kappa beta
LPO	Lipoperoxidação
MAT	Metionina adenosiltransferase
MDA	Malondialdeido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> = capacidade de absorção do radical oxigênio
Pad	Padrão
PBS	Tampão fosfato dibásico
PL	Permeabilidade
PTn	Proteína
RI	Resistência à insulina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SAMe	S-adenosilmetionina
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
TAG	Triacilglicerídeos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNB	Ácido-2-nitro-5-mercaptobenzoico
TNF α	Fator de necrose tumoral
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i> = Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO GERAL	19
2.1	Objetivos específicos	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	Doença hepática não alcoólica	20
3.2	Espécies reativas de oxigênio EROs	23
3.3	Defesas antioxidantes	26
3.4	Papel do estresse oxidativo em processos fisiopatológicos	31
3.5	O uso de dieta experimental para a indução do dano hepatocelular	34
3.6	Métodos de determinação da atividade antioxidante	35
3.6.1	Método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	38
3.6.2	Peroxidação lipídica, análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	39
3.6.3	Proteínas carboniladas	39
3.6.4	Catalase (CAT)	40
3.6.5	Superóxido dismutase (SOD)	41
3.6.6	Tiois totais (SH)	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	Materiais e equipamentos	43
4.2	Métodos	43

4.2.1	Animais de experimentação e tratamento dietético	43
4.2.2	Preparo da amostra do tecido hepático	50
4.2.3	Preparo da amostra de sangue	51
4.2.4	Dosagem de proteína pelo método de Lowry	51
4.2.5	Análises para avaliação do estresse oxidativo	52
4.2.5.1	Tiois reduzidos totais	52
4.2.5.2	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	53
4.2.5.3	Proteínas carboniladas	54
4.2.6	Ensaio de atividades enzimáticas	55
4.2.6.1	Catalase (CAT)	55
4.2.6.2	Superóxido dismutase (SOD)	56
4.2.6.3	Análise da atividade sequestrante frente ao DPPH	56
4.2.7	Análise histológica do fígado	57
4.2.8	Análise estatística	68
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Análise histológica	59
5.2	Peso dos animais e ingestão dietética	64
5.3	Dosagem de proteínas	66
5.4	Avaliação da capacidade sequestrante de DPPH em soro sanguíneo	67

5.5	Avaliação da capacidade sequestrante de DPPH em extrato hepático	69
5.6	Dosagem de produtos de peroxidação lipídica (TBARS)	70
5.7	Dosagem de grupamentos carbonilados	72
5.8	Avaliação enzimática da catalase (CAT)	74
5.9	Avaliação da enzima superóxido dismutase (SOD)	75
5.10	Dosagem de tiois totais (SH)	77
5.11	Correlação DPPH extrato e biomarcadores do desequilíbrio redox (TBARS, CARBONIL, CATALASE e SOD)	78
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio, que sofre redução, durante a respiração mitocondrial leva à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), algumas das quais apresentam natureza radicalar (ROESLER et al., 2007). Radicais são espécies com elétrons desemparelhados e, de modo geral, apresentam tempo de meia vida curto (CAREY e SUNDBERG, 2008).

O estresse oxidativo (EO) é decorrente de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes, especialmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante presentes em sistemas biológicos, com favorecimento dos Oxidantes (BARRA et al., 2010), contribuindo para mudanças estruturais em proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, entre outras moléculas com função biológica. Em geral, estes eventos provocam ruptura das membranas celulares, proporcionando a liberação de conteúdos celulares e levando à morte da célula (DEN BOER et al., 2004). De modo geral, este desequilíbrio está relacionado com algumas patologias, que incluem câncer, neurodegeneração, arteriosclerose e injúria por isquemia/reperfusão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Em nosso organismo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) como, ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}), são produzidas naturalmente por meio de processos metabólicos redox, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (por exemplo: regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes). Macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos, na produção de energia e na desintoxicação de drogas (SARMENTO et al., 2011).

Inúmeros processos metabólicos ocorrem no fígado e como consequência a formação destas espécies reativas. O tecido hepático gera níveis baixos de EROs, especialmente, ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na mitocôndria e, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como uma função normal das várias oxidases. Cada hepatócito expressa superóxido dismutase (SOD_1 no citosol, SOD_2 na mitocôndria), glutathione peroxidase (citoplasma e mitocôndrias), catalase (peroxissomos), tioredoxinas (Trx1 no citosol, Trx2 na mitocôndria) e peroxiredoxinas (Prx-I, -II, -VI no citosol, Prx-III -V nas mitocôndrias) e contém glutathione em concentração da ordem de Milimolar (mM) em todos os compartimentos celulares, vitamina E responsável pela interrupção da cadeia radicalar em membranas celulares; além de manter íons ferro redox-ativos intimamente ligados a proteínas de armazenamento ou de transporte. Além disso, a glutathione parece ser principal antioxidante hepático e/ou o mais precoce em executar esta função (BROWNING; HORTON, 2004; CHEN et al., 2013).

Diante destas características, o fígado torna-se um sistema de defesa eficiente contra o acúmulo de EROs e prevenção do estresse oxidativo. No entanto, na presença de injúria hepática, esta função apresenta-se prejudicada (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2011). O acúmulo de lipídios nos hepatócitos, chamado de dano hepatocelular (DHC), pode ocorrer devido a um desequilíbrio no *turnover* dos triglicerídeos, resultando no aumento no fluxo hepático de ácidos graxos provenientes tanto da dieta quanto da lipólise periférica, ou do aumento do estímulo da síntese hepática de triglicerídeos a partir da glicose, frutose e aminoácidos por meio da síntese “de novo” de ácidos graxos (CAVE et al., 2007). O dano hepatocelular (DHC) é um problema clínico crescente em todo o mundo. Ele está associado com a obesidade, resistência à insulina (RI), diabetes mellitus (DM) e síndrome metabólica (SM) e é uma das alterações que caracterizam a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA). A DFGNA é histologicamente classificada em DHC e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). DHC é caracterizado pelo acúmulo de gordura hepática sem qualquer evidência de lesão hepatocelular na forma de hepatócitos balonizados, enquanto a EHNA o é pela presença de DHC e inflamação com lesão hepatocelular (hepatócitos balonizados), com ou sem fibrose (BROWNING; HORTON, 2004).

Em experimento animal, ratos submetidos a uma alimentação rica em gorduras apresentaram um aumento significativo nos produtos de peroxidação lipídica e diminuição na defesa antioxidante, favorecendo ao desequilíbrio redox em favor dos oxidantes (BITENCOURT et al., 2007). O excesso de lipídios nos hepatócitos resulta em extensiva oxidação nas mitocôndrias e aumento na produção de radicais livres, levando à disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à insuficiente oxidação de ácidos graxos (VIAL et al., 2011). Além disso, já está bem estabelecido que o EO leva à progressão da DFGNA, com a evolução da DHC para a EHNA. A EHNA resulta no aumento da expressão do citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) com significativa elevação nos níveis de EROs e subsequente peroxidação de lipídios, formação de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (YAMAGUCHI et al., 2007).

No presente trabalho, foram utilizados modelos animais e diferentes dietas, de modo a provocar a DFGNA, em diferentes estágios, pela retirada de fatores lipotróficos. Foram avaliados biomarcadores do estresse oxidativo, de modo a observar a influência do EO nos diferentes graus de agravamento da doença. A compreensão mais aprofundada desta relação entre DFGNA + EO poderá auxiliar na elucidação das vias patogênicas de DFGNA e em futuros e mais efetivos tratamentos para esta doença e outras com bases bioquímicas semelhantes.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar biomarcadores de estresse oxidativo em plasma e extrato hepático de ratos *Wistar* submetidos a diferentes modelos dietéticos indutores da doença do fígado gorduroso não alcoólico (DFGNA).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade da enzima catalase e superóxido dismutase no tecido hepático dos modelos experimentais;

Quantificar níveis de peroxidação lipídica via quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA), em extrato hepático dos modelos experimentais;

Quantificar os níveis de grupamentos tiólicos nos tecidos hepáticos dos modelos experimentais;

Quantificar níveis de proteínas carboniladas nos tecidos hepáticos dos modelos experimentais;

Avaliar a ação sequestradora em relação ao DPPH do soro e extrato de tecidos hepáticos dos modelos experimentais;

Correlacionar os resultados obtidos com as várias fases, e modelos dietéticos, indutores da doença do fígado gorduroso.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença hepática não alcoólica

O dano hepatocelular (DHC) é uma complicação hepática extremamente comum, que decorre do acúmulo de gordura histologicamente visível nos hepatócitos. O conteúdo de triacilglicerídeos (TAG) nas células hepáticas é regulado pela atividade integrada de biomoléculas que facilitam a entrada desses triglicerídeos no fígado, a síntese de ácidos graxos e sua esterificação, *input*, e a oxidação de ácidos graxos e exportação de TAG hepáticos, *output*. A esteatose ocorre quando há maior captação do que oxidação ou exportação de TAG (DEN BOER et al., 2004), ou seja, quando a quantidade de ácidos graxos importado ou sintetizado pelo fígado excede a quantidade de exportação, síntese e secreção de lipoproteína de baixa densidade VLDL ou do catabolismo β -oxidação, respectivamente (ANSTEE; DAY, 2013).

A infiltração gordurosa é uma típica resposta hepática à exposição prolongada a estímulos nocivos. Classicamente pode ser subdividida como de origem alcoólica (decorrente da ingestão de etanol) e não alcoólica, incluindo hipóxia, outras toxinas diferentes do álcool, inflamação sistêmica, malignidades, deficiências, inanição e vários distúrbios metabólicos (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003). Entretanto, o fígado gorduroso é considerado uma condição benigna, pois, apenas 3% dos casos evoluem para estágios mais avançados de alteração hepática, como fibrose, cirrose, hepatocarcinoma e necrose (NEUSCHWANDER-TETRI; CALDWELL, 2003).

A patogênese do dano hepatocelular não alcoólica é multifatorial; no entanto, tem-se sugerido que a resistência à insulina, associada à síndrome metabólica (SM), frequentemente observada em indivíduos com sobrepeso e obesidade, é um requerimento essencial para o acúmulo de gordura no hepatócito (CHITTURI et al., 2002).

O mecanismo que descreve a progressão de EH para EHNA não é conhecido. A hipótese mais aceita atualmente é a do modelo dos dois *hits* (ANSTEE; DAY, 2013); O primeiro *hit* é constituído pelo mecanismo que causa o DHC, ou seja, o acometimento inicial. Assim, a resistência à insulina, que promove hiperinsulinemia, favorecendo a lipólise no tecido adiposo, aumenta excessivamente a contribuição de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, podendo resultar em DHC. O primeiro *hit* deixa o hepatócito mais vulnerável ao segundo *hit*, ou seja, agressões promovidas por vírus, álcool e lipopolissacarídeos, dentre outros, os quais promovem estresse oxidativo hepático, levando à EHNA, à cirrose e ao hepatocarcinoma (KANURI; BERGHEIM, 2013).

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese do dano hepatocelular e esteato-hepatite. A utilização de modelos animais permite melhor entendimento de sua fisiopatologia e evolução para as fases mais avançadas da doença, além disso, possibilita o estudo dos mecanismos de ação de várias terapêuticas disponíveis para o auxílio em seu tratamento (ZAMIN et al., 2009).

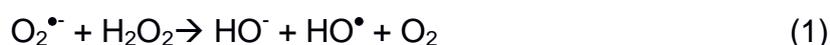
A indução da DFGNA tem sido realizada através de medicamentos, tais como tetraciclina, amiodarona, corticosteróides, entre outros; com a utilização de ratos geneticamente obesos ou com manipulação genética, ou ainda pela utilização de dietas que promovem a sua ocorrência, seja por serem ricas em gordura ou açúcar, seja pela restrição de aminoácidos. Os modelos genéticos da DFGNA utilizam animais que possuem alguma mutação espontânea que promove a doença ou linhagens de animais geneticamente modificadas em laboratório (ZAMIN et al., 2009). A deficiência de alguns componentes dietéticos pode provocar a DFGNA. Como exemplo, tem-se a eliminação de metionina e colina da dieta, ocasionando acúmulo de gordura intra-hepática. A metionina e a colina são precursores importantes da fosfatidilcolina (Figura 1), o fosfolípido principal que compreende o revestimento exterior das partículas de VLDL. Nesta situação, a esteatose é resultado da secreção hepática prejudicada de TAG, devido à formação defeituosa de VLDL (VETELÄINEN; VAN VLIET; VAN GULIK, 2007).

3.2 Espécies reativas de oxigênio EROs

São moléculas ou radicais formados a partir de reações de transferência de elétrons ao oxigênio que estão envolvidas no metabolismo aeróbio. EROs são fundamentais nos processos bioquímicos vitais como, por exemplo, diferenciação celular e apoptose celular, entretanto o comprometimento no estado redox leva a um desequilíbrio em favor dos pró-oxidantes, com consequentes danos oxidativos a biomoléculas como proteínas e lipídios (MÉNDEZ et al., 2013).

A produção de EROs ocorre na mitocôndrias, lisossomos, membranas celulares e no citoplasma. Para a geração de EROs, a mitocôndria é o local de maior produção. Nesta organela, a reação ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial através de citocromo oxidases, sendo a principal fonte de espécies reativas derivadas da redução univalente do O_2 , gerando radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em seguida, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para então ocorrer à geração do radical hidroxila (OH^{\cdot}). Além disso, certas espécies podem causar danos oxidativos a macromoléculas, com geração da peroxidação lipídica, com destruição de membranas, levando à morte celular. A produção de EROs e o estresse oxidativo estão presentes na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, como por exemplo a doença hepática não alcoólica, caracterizada pelo excesso da deposição de gordura nos hepatócitos. Nesta doença, o estresse oxidativo ocorre por um maior disponibilidade de substrato oxidável (ácidos graxos) às mitocôndrias com posterior disfunção e liberação de EROs para o meio celular. (VASCONCELOS et al., 2007; VETELÄINEN; VAN VLIET; VAN GULIK, 2007).

O ânion radical superóxido é precursor de espécies oxidantes mais potentes, como observado na equação 1, cuja produção depende da presença simultânea de peróxido de hidrogênio, pela reação de Haber-Weiss (Equação 1):



Em reação que ocorre em duas etapas e é catalisada por íon Fe^{3+} , gera-se o radical hidroxila. O $O_2^{\cdot-}$ participa da redução do íon férrico à espécie ferrosa

Fe^{2+} (Equação 2) que pode, por sua vez, reduzir o peróxido de hidrogênio (Schneider, 2013) (Equação 3), em processo conhecido como reação de Fenton:



O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido no organismo, principalmente por dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), a partir do ânion radical superóxido (Equação 4).



Outra contribuição importante para a geração de H_2O_2 no organismo é dada por fagócitos ativados, onde o peróxido é produzido pela dismutação não enzimática do íon radical superóxido produzido pela NADPH oxidase (DE MELO LUCENA et al., 2010).

Embora estas espécies reativas estejam envolvidas na regulação de processos fisiológicos, o excesso na produção destes compostos leva à superestimulação de algumas vias intracelulares, que geralmente estão associadas ao aparecimento de diversas doenças. Além disso, a própria natureza reativa destas espécies leva a modificações em biomoléculas e provoca alterações em suas estruturas e funções. Entre as alterações mais drásticas encontram-se alterações na ribose e bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico (DNA); ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, DNA e proteínas e proteína-proteína; formação de adutos; peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que compõem membranas plasmáticas e lipoproteínas (DE MELO LUCENA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

Segundo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007) estão relacionadas, tabela 1, as espécies consideradas EROs: radicais hidroxila, superóxido, peroxila e alcóxila, e espécies não radicalares como oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ânion peroxinitrito (ONOO^-).

Tabela1 – Espécies reativas de oxigênio, tempos de meia vida e algumas características.

Espécies reativas	Tempo de meia vida (s)	Características
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	10^{-6}	Gerado na mitocôndria, em sistema vascular e outros.
Radical hidroxila (HO^{\bullet})	10^{-9}	Altamente reativo, gerado em excesso de ânion radical superóxido e ácidos graxos e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Estável	Formado no organismo humano via amplo número de reações, formando radicais potentes como HO^{\bullet} .
Radical peroxila (ROO^{\bullet})	10^{-6}	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, açúcares etc. durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico ($ROOH$)	Estável	Reage com íons metálicos formando espécies reativas.
Oxigênio singleto (1O_2)	10^{-5}	Altamente reativo formado por fotossensibilização e por reações químicas.
Ozônio(O_3)	Estável	Presente como poluente atmosférico, pode reagir com varias moléculas, produzindo 1O_2 .

Fonte: Halliwell, 2007.

O H_2O_2 , apresentado na tabela 1, possui uma reatividade baixa, embora seja capaz de inativar certas enzimas, principalmente pelas oxidações de grupos tiois essenciais. Seu maior potencial oxidante é exercido, entretanto, pela forma indireta, por meio da geração de HO^{\bullet} , produzido via reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio, nestas condições, torna-se um bom oxidante, pois em concentrações adequadas e combinado ao ferro pode aumentar sua toxicidade de

10 até 100 vezes, desta forma, sendo prejudicial às estruturas celulares (SCHNEIDER; CUERVO, 2013).

O HO[•], espécie química com alta reatividade, tem a capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas biológicas como ácidos graxos poli-insaturados modificando suas funções. O HO[•] é produzido pela reação de Fenton, ou ainda, pela exposição das células a radiações ionizáveis. A velocidade de reação deste radical é muito alta, reagindo praticamente com qualquer molécula do organismo vivo, assim que gerado, numa reação controlada pela velocidade de difusão do radical (BARRA et al., 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

3.3 Defesa antioxidante

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em baixa concentração comparada aquela de um substrato oxidável, atrasa, significativamente, ou ainda evita a oxidação deste substrato. Em nível fisiológico, o organismo humano possuiu reservas antioxidantes celulares que combatem danos provocados pelas EROs. A principal função dos antioxidantes é reduzir a propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou eliminando-as (BARRA et al., 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O sistema de defesa está subdividido em enzimático e não enzimático, o primeiro inclui enzimas como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O sistema enzimático age por mecanismo de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicalares, envolvidas com a iniciação de reações em cadeia que levam à propagação e ao aumento de ocorrência de dano oxidativo (BARRA et al., 2010). Os antioxidantes, principalmente na peroxidação lipídica, podem ser classificados em primários: aqueles que interrompem a cadeia de reações envolvidas na oxidação lipídica através de doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos energeticamente mais estáveis e antioxidantes

secundários: aqueles compostos que reduzem ou retardam a taxa de iniciação da oxidação por decompor hidroperóxidos (NACZK; SHAHIDI, 2004).

As principais formas da enzima SOD, encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol (dimérica), além de lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica), líquido extracelular a MnSOD localizada na mitocôndria. A maioria das análises de SOD é realizada, verificando-se a atividade de SOD indiretamente, geralmente por adição ao eritrócito do sistema xantina - xantina oxidase como fonte de $O_2^{\bullet-}$ e um composto que seja reduzido pelo $O_2^{\bullet-}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A CAT, cujo sítio ativo contém o grupo heme, atua principalmente, enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco. Nos dois protocolos mais utilizados para estudo de sua atividade utiliza-se a medida do decaimento na concentração de H_2O_2 e da geração do oxigênio (BARRA et al., 2010).

A GPx reduz H_2O_2 a água ou álcool. Constitui um grupo de enzimas apresentado sob 4 formas: GPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo, GPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal, GPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos e a GPx 4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (WU et al., 2010).

A defesa não enzimática inclui compostos antioxidantes de origem dietética, dentre os quais se destacam vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico, o α -tocoferol e o β -caroteno, são compostos vitamínicos com um alto potencial antioxidante, assim como outros carotenoides, por exemplo, licopeno, luteína e zeaxantina. Dentre os minerais, destacam-se o cobre, o zinco,

o selênio e o magnésio (PRASAD, 2007) (Tabela 2). Esses antioxidantes reagem com radicais livres e inibem a iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais, diminuindo assim o efeito acumulativo dos danos oxidativos no organismo (KOH et al., 2011).

Tabela 2 – Identificação dos antioxidantes e respectivas funções: segundo obtenção e atuação.

Funções	Prevenção	Sequestro	Reparo
Antioxidantes Dietéticos	Zinco, Selênio	Ácido ascórbico, α - tocoferol, Carotenóides	
Antioxidantes Extracelulares	Albumina, Bilirrubina Mioglobina	Ácido ascórbico, α - tocoferol, Carotenóides	
Antioxidantes Intracelulares	Glutathiona peroxidase Superóxido dismutase, Catalase	Ácido ascórbico, α - tocoferol, Carotenóides	Metaloenzimas (Zinco)

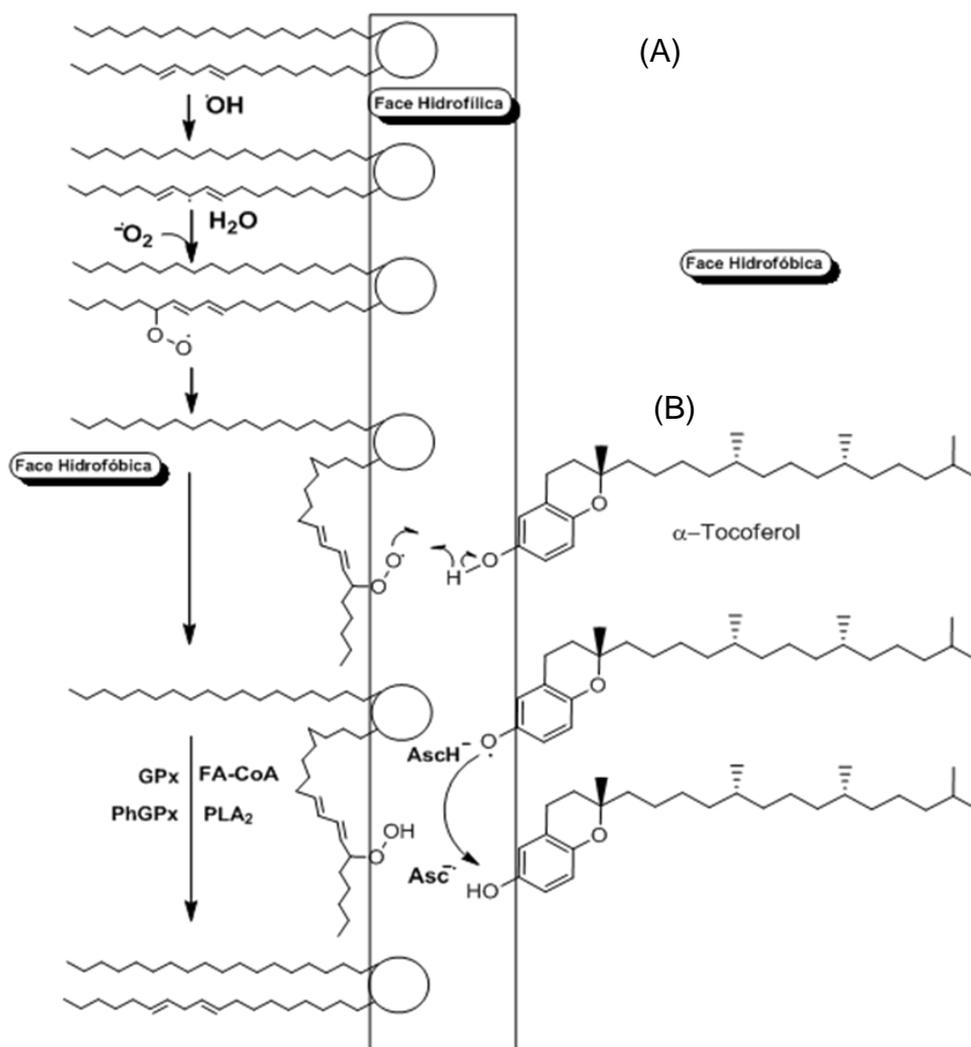
Fonte: autor, 2014.

O ácido ascórbico, descrito na tabela 2, é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95% da vitamina C (AsCH_2) encontra-se na forma de ascorbato, AsCH^- , que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um $\text{H}\cdot$ ou $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$ para um radical. O ascorbato (AsCH^-) atua como antioxidante sobre ERO, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ($\text{Asc}\cdot$), ou ascorbila, pouco reativo. Onde atua eficientemente sobre o $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\text{HO}\cdot$ (SHILS et al., 2009).

A vitamina E é a designação comum de duas diferentes famílias de compostos que ocorrem na natureza: os tocoferóis e os tocotrienóis, que exibem,

qualitativamente, a atividade biológica do α -tocoferol, que é o composto mais potente e, geralmente, a forma predominante. Estruturalmente, tocoferóis e tocotrienóis diferem apenas na cadeia lateral e ambos se subdividem em α , β , γ e δ , dependendo do número e posição de grupos metila no anel cromanol (VASCONCELOS et al., 2007). O tocoferol é o antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas e lipoproteínas. Intercepta o radical peroxila (RO_2^\bullet), resultando (Figura 2) na formação do radical tocoferila, que será regenerado pelo ascorbato, glutathiona ou ubiquinol a tocoferol (BARREIROS; DAVID, 2006). A vitamina E mantém sua atividade antioxidante, somente na presença de baixas quantidades de ascorbato (SHILS et al., 2009).

Figura 2 – Etapas de propagação e terminação da lipoperoxidação e ação antioxidante do α -tocoferol em membranas celulares.



Fonte: autor, 2014

Notas: (A) Iniciação: o grupo metileno de ácidos graxos poli-insaturados é atacado por radicais livres, havendo o rearranjo das duplas ligações na forma de dieno conjugado. Simultaneamente há formação de um radical alquila ($\text{R}\cdot$) no carbono central. O radical alquila reage com O_2 formando alquilperoxila ($\text{ROO}\cdot$). Propagação: $\text{ROO}\cdot$ ataca outras moléculas de lipídios (não ilustrado). Terminação: as reações em cadeia são interrompidas por interação entre os próprios radicais (não ilustrado), ou (B) entre radicais e α -tocoferol, originando produtos não-radicalares e o radical tocoferila. O radical α -tocoferila é reduzido por ação do ascorbato.

Os carotenóides são pigmentos intensamente coloridos, lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos, presentes em muitos alimentos, particularmente frutas, vegetais e peixes. As propriedades antioxidantes dos carotenóides estão associadas com sua capacidade de capturar radicais e outras espécies, como $^1\text{O}_2$, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos em condições fisiológicas (SHILS et al., 2009).

3.4 Papel do estresse oxidativo em processos fisiopatológicos

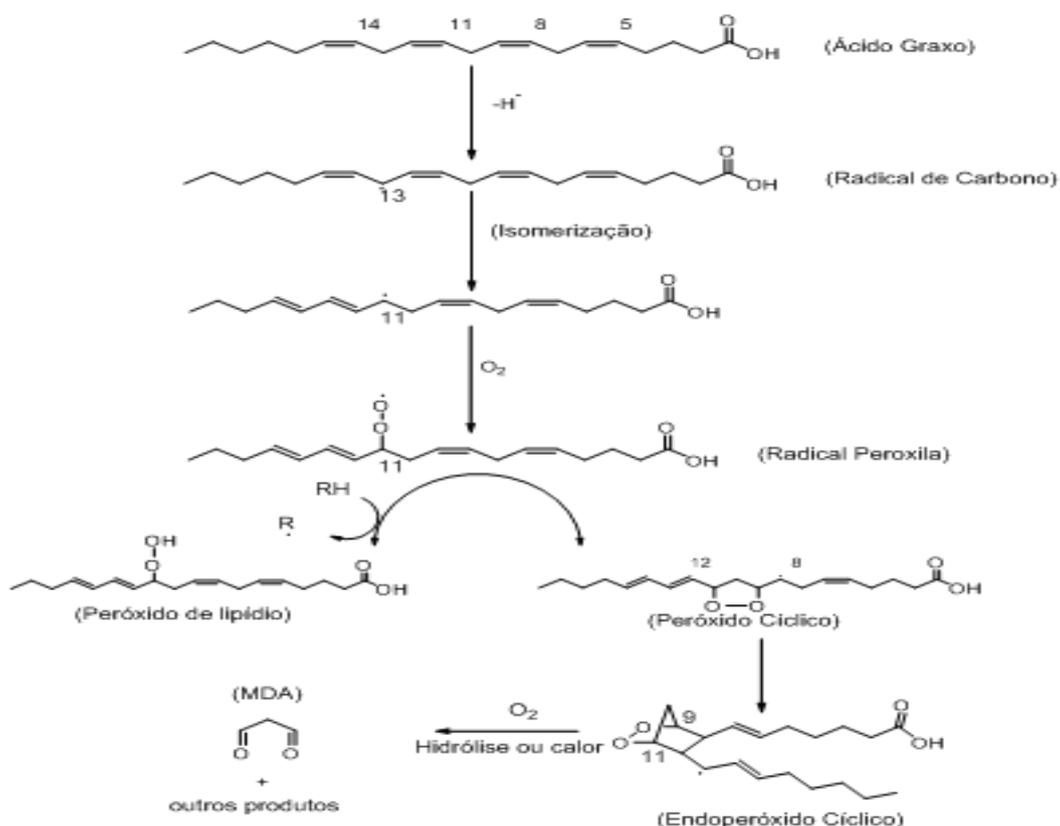
As espécies reativas de oxigênio são capazes de interferir em vários processos biológicos, onde o dano causado está relacionado com a da espécie reativa e a molécula atacada. Os principais alvos das ER são as biomoléculas. Em condições adversas, como na quebra da homeostase, ocorre a superprodução de espécies reativas, as enzimas responsáveis pela decomposição destas espécies não conseguem exercer sua função plena aumentando assim o dano aos tecidos. Estas espécies, quando radiculares, reagem com endobióticos e podem desencadear reações em cadeia, originando um grande número de novos radicais livres que sofrem os processos de terminação, quando em presença de substâncias antioxidantes ou outros radicais (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) das membranas celulares são rapidamente atacados por radicais oxidantes. A destruição oxidativa dos AGPI, conhecida como lipoperoxidação (LPO) é danosa por desencadear reações de autopropagação na membrana (REED, 2011). Há abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) do carbono bis-alílico de uma molécula de AGPI. Embora todos os componentes celulares sejam suscetíveis, a membrana é uma das mais atingidas, acarretando mudança estrutural na permeabilidade da membrana celular (RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013).

Contrastando com o radical hidroxila, o ânion radical superóxido apresenta menor reatividade para abstrair hidrogênio de ácidos graxos; ainda que sua reatividade fosse alta, o fato deste radical apresentar carga negativa

representa um impedimento para entrar em ambiente hidrofóbico. A forma protonada do ânion radical superóxido, o radical peridroxila é mais reativo e pode abstrair um hidrogênio de um ácido graxo isolado, como nos ácidos araquidônico, linoléico e linolênico. Entretanto, o radical peridroxila parece estimular um processo de peroxidação lipídica já iniciada, pela reação com hidroperóxidos de lipídio (LOOH)(VALKO et al., 2007).

Figura 3 – Esquema geral da peroxidação lipídica com formação de biomarcadores de dano oxidativo como: malondialdeído (MDA), segundo Halliwell 2000.



Fonte Halliwell, 2000.

Notas: o radical de carbono formado após a abstração do próton onde reage com oxigênio, produzindo o radical peroxila (ROO^{\cdot}). O radical peroxila pode então reagir com uma nova molécula de ácido graxo poli-insaturado (RH), transformando-se em um peróxido de lipídio ($ROOH$). O termo peróxido de lipídio se refere também a peróxidos cíclicos, produtos intermediários da lipoperoxidação, que através do calor ou hidrólise sofre uma quebra formando o MDA.

A figura 3 mostra um esquema resumido da peroxidação lipídica. Os efeitos desta peroxidação são: a diminuição na fluidez da membrana, facilidade na troca de fosfolipídios entre as duas monocamadas da célula, aumentando a permeabilidade da bicamada da membrana a substâncias que normalmente não atravessam a mesma, a não ser em canais específicos, e inativação do sistema enzimático ligado à membrana celular (KÜHN; BORCHERT, 2002).

A geração de radicais peroxila e alcoxila, aldeídos e outros produtos de peroxidação lipídica, em sistemas de membranas e em lipoproteínas podem causar danos severos às proteínas presentes. É comprovado que os receptores de superfície celular, que permitem às células responder aos hormônios e citocinas, podem ser inativados durante a peroxidação lipídica, da mesma maneira que enzimas como a Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático e a Na^+, K^+ -ATPase envolvida na manutenção do balanço iônico das células. Nas mitocôndrias, tanto as enzimas da matriz como os componentes da cadeia respiratória podem ser danificados, com a destruição da ubiquinona, que é uma benzoquinona que participa da produção de ATP. Ela é considerada uma coenzima (coenzima Q_{10}) ou simplesmente CoQ_{10} , e está presente em todos os órgãos que produzem grandes quantidades de energia como cérebro, coração, rins e fígado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Todos os resíduos de aminoácidos de proteínas são suscetíveis à oxidação por radical hidroxila (HO^\bullet); entretanto, os grupos tiois presentes nos aminoácidos cisteína e metionina são especialmente oxidáveis pelo ataque de vários EROs (Equação 6). Além disso, pela reação direta destes grupos com metais de transição, pode haver a formação de radicais tiila (RS^\bullet):



A metionina é rapidamente oxidável por HO^\bullet , $^1\text{O}_2$ e H_2O_2 . Os resíduos de metionina, em geral, são essenciais para a atividade de proteínas, como por exemplo, a habilidade da α_1 -antiproteínase de inibir a atividade da elastase, que é uma enzima capaz de hidrolisar a ligação das fibras elásticas do nosso organismo.

3.5 Uso de dieta experimental para a indução do dano hepatocelular

Deficiências nutricionais em proteína e/ou micronutrientes como vitaminas e minerais levam ao prejuízo da capacidade antioxidante, pois as proteínas fornecem aminoácidos necessários para a síntese de enzimas antioxidantes. Além disso, vários micronutrientes fazem parte do sítio ativo necessário para a função da enzima antioxidante ou atuam como cofatores na regulação de enzimas antioxidantes. A exposição a produtos químicos ambientais é quase que inevitável, uma vez que ocorrem através do consumo de alimentos, água e bebidas contaminadas. Desta forma para uma melhor compreensão de certas patologias são necessários estudos de interação com certas dietas e os processos metabólicos que possam ser afetadas por elas, de forma a desencadear certas anomalias como, por exemplo, a DFGNA (LUO et al., 2006).

Modelos animais de doenças humanas são recursos importantes porque eles podem ser usados para monitorar complexas interações entre as células e os tecidos, durante a evolução de uma doença. O valor final de qualquer modelo animal depende de sua reprodutibilidade e do grau de semelhança com a doença em seres humanos. Um dos principais objetivos da investigação da doença do fígado gorduroso em roedores é encontrar uma determinada combinação de dieta, exercício e antecedentes genéticos que assim irão causar uma síndrome semelhante à doença do fígado gorduroso não alcoólica em humanos (DFGNA). O uso desta dieta deficiente nesses aminoácidos acarreta o desenvolvimento do DHC, levando estes animais a não secreção de triglicerídeos do fígado para a corrente sanguínea na forma de VLDL (CORBIN; ZEISEL, 2012; MAHER, 2011).

Observou-se que a dieta deficiente em colina (DC) induz esteatose menos severa, quando comparada com a inflamação progressiva e a fibrinogênese induzidas pela dieta deficiente em metionina e colina (DCM), em ratos (VETELÄINEN; VAN VLIET; VAN GULIK, 2007).

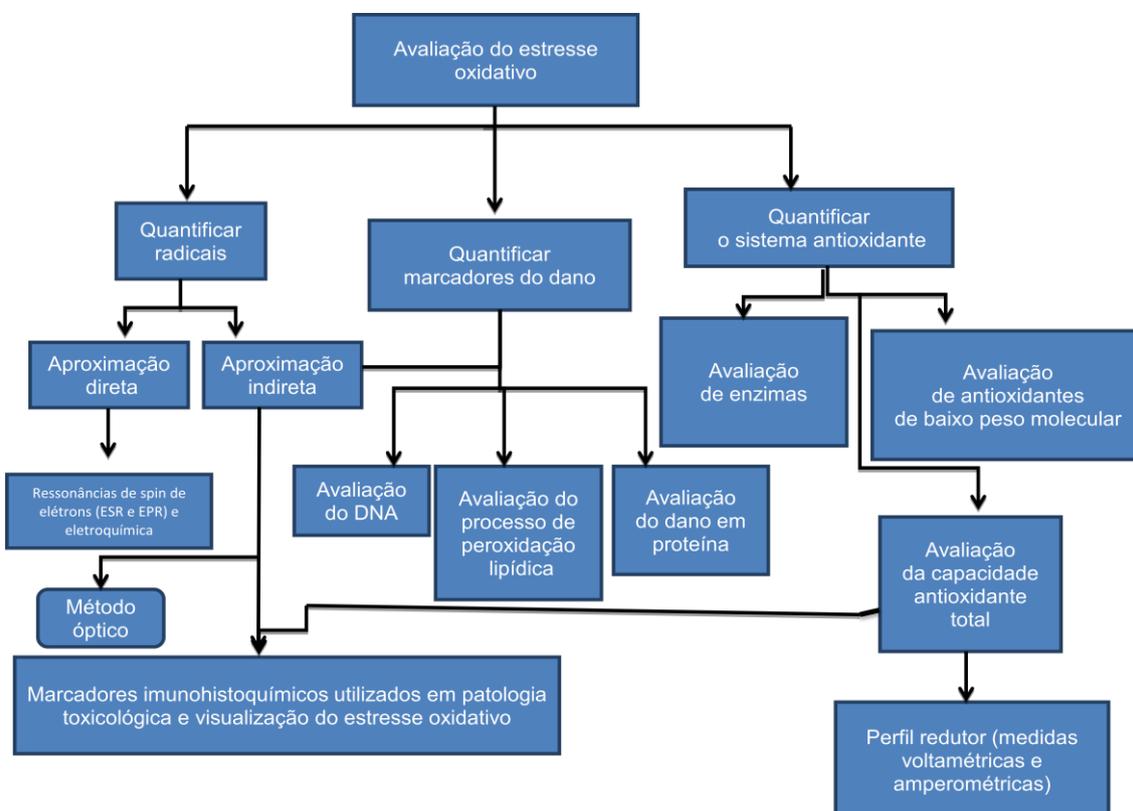
A dieta DCM é um modelo nutricional padrão para roedor que causa características de EHNA no animal, semelhante ao que acontece em humanos, incluindo esteatose, inflamação hepática e fibrose (IP et al., 2004; WELTMAN;

FARRELL; LIDDLE, 1996). Estudos demonstram que as dietas DC e DCM representam dois modelos patogênicos diferentes de esteatose. Ratos e camundongos alimentados com dietas deficientes em colina e metionina são severamente exauridos de antioxidantes hepáticos, como de glutathiona reduzida (GSH) e de S-adenosilmetionina. Tais animais são mais vulneráveis ao estresse oxidativo, uma situação que induz à síntese de TNF α e outras citocinas pró-inflamatórias. Agentes oxidantes e o TNF α ativam a enzima inibidora da quinase Kappa beta (IKK β) nos adipócitos e hepatócitos, induzindo à resistência à insulina e à DFGNA(ANSTEE; DAY, 2013).

3.6 Métodos de determinação da atividade antioxidante

Diversas técnicas são utilizadas para determinar atividade antioxidante *in vitro* (figura 4).

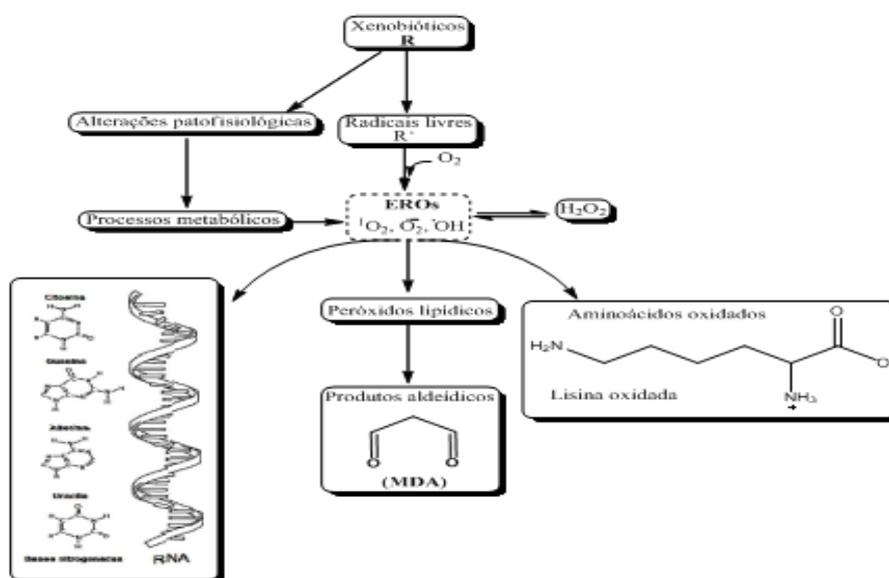
Figura 4 – Principais métodos de avaliação do estresse oxidativo.



A maioria dos métodos para identificação de ERO é óptico e se baseia nas reações com várias moléculas detectoras que são modificadas por reações químicas específicas para gerar sinais luminescentes ou fluorescentes (AL GHOULEH et al., 2011). As sondas fluorescentes baseadas em pequenas moléculas orgânicas tornaram-se ferramentas indispensáveis por proporcionarem informação dinâmica sobre a localização e quantidade das moléculas de interesse, sem a necessidade de engenharia genética na amostra (MARCOLIN et al., 2011).

A mensuração da atividade antioxidante verifica a presença cumulativa de todos os antioxidantes presentes em extratos ou amostras biológicas, sendo, desta forma, uma análise de parâmetros integrados. A capacidade antioxidante é um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no estresse oxidativo *in vivo*, podendo auxiliar na descoberta de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, fornecendo informações sobre a biodisponibilidade e absorção de compostos antioxidantes (AL GHOULEH et al., 2011). No estudo do estresse oxidativo algumas macromoléculas podem ser usadas como biomarcadores deste quando oxidadas por EROs, e estão resumidamente apresentadas na figura 5.

Figura 5 – Produtos da reação das EROs sobre diferentes substratos com geração de produtos oxidados em macromoléculas.



Fonte: autor, 2014.

Um fator determinante para atividade antioxidante de substâncias naturais é se esta tem afinidade pelo meio lipofílico ou hidrofílico. Por exemplo, substâncias polares são mais efetivas em grandes quantidades de óleo porque podem se acumular na interface ar-óleo ou em micelas reversas dentro deste, onde as reações de oxidação lipídica ocorrem com maior frequência devido à alta concentração de oxigênio. Em contraste, antioxidantes não polares são mais efetivos em emulsões porque são retidos nas gotículas de óleo e/ou acumulados na interface óleo-água, onde ocorre a interação entre os hidroperóxidos das gotículas e substâncias pró-oxidante da fase aquosa, como, por exemplo, os metais de transição (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

As metodologias para avaliar a capacidade antioxidante são numerosas e estão, em sua maioria, sujeitas a interferentes como substâncias que interferem positivamente nas análises ocorrendo um falso positivo, isto significa que pode dar um resultado maior por ação de substâncias que reagem e são detectadas em um mesmo comprimento de onda dos analitos em questão. Para evitar erros, é necessário analisar os antioxidantes por, pelo menos duas técnicas, isto por que nenhum ensaio realizado isoladamente irá refletir exatamente a capacidade antioxidante total de uma amostra (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Com base nas reações químicas envolvidas, boa parte dos métodos para avaliar a atividade antioxidante está dividida em duas categorias, a primeira envolve reações de transferência de elétrons, representada pelo método de Folin-Ciocalteu e sequestro de radicais livres, a segunda na transferência de átomos de hidrogênio, como pelo método de DPPH e sistemas β -caroteno/ácido linoléico (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Devido à dificuldade de avaliar cada antioxidante separadamente e suas interações, inúmeros métodos têm sido propostos, embora nenhum tenha sido validado até o momento. Segundo (BRAY, 2004), os métodos para avaliar o estresse oxidativo estão baseados em diferentes estratégias: o primeiro consiste em medir o produto gerado pelo dano oxidativo em amostra biológica; o segundo consiste em medir o equilíbrio entre sistema pró- e antioxidante; o terceiro em

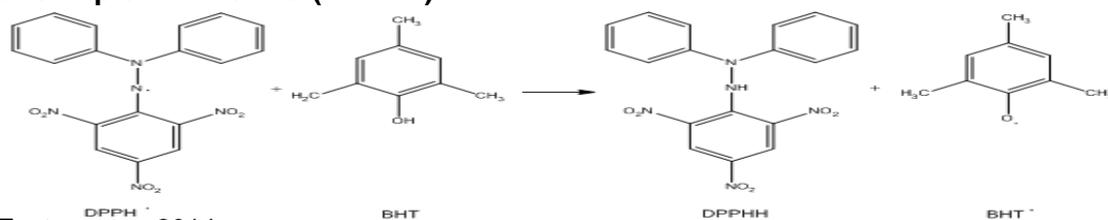
avalia a vulnerabilidade da amostra à oxidação após a adição de um pró-oxidante externo; o quarto envolve a detecção de eventos primários como a ativação de fatores de transcrição que antecedem o dano oxidativo e em quinto, uma abordagem clínica que utiliza métodos não invasivos como ressonância magnética para diagnosticar manifestações primárias provocadas pelo estresse oxidativo. Alguns dos métodos são descritos a seguir:

3.6.1 Método 2, 2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Um dos métodos para avaliar a capacidade antioxidante do meio é a atividade sequestrante frente ao DPPH, (Figura 6) radical estável, que se baseia no sequestro de prótons, após redução, ou de radical hidrogênio, o que é acompanhado por um descolorimento da solução contendo o DPPH, de coloração violeta que quando recebe um átomo de hidrogênio descora para uma coloração amarelo clara, a depender da concentração da espécie doadora de H (DE SOUSA et al., 2013; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Esta habilidade foi primeiramente avaliada espectroscopicamente por Ressonância do Spin do Elétron (RES), da forma que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante e o tempo de reação. No entanto, o método de controle mais utilizado é o decaimento da absorbância no comprimento de onda observado entre 515 a 528 nm, produzido pela adição do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonóides e terpenoides.

Figura 6 – Reação de redução do radical DPPH, quando este abstrai um átomo de hidrogênio do meio protetor (antioxidante), representado por BHT, reduzido a 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPHH).

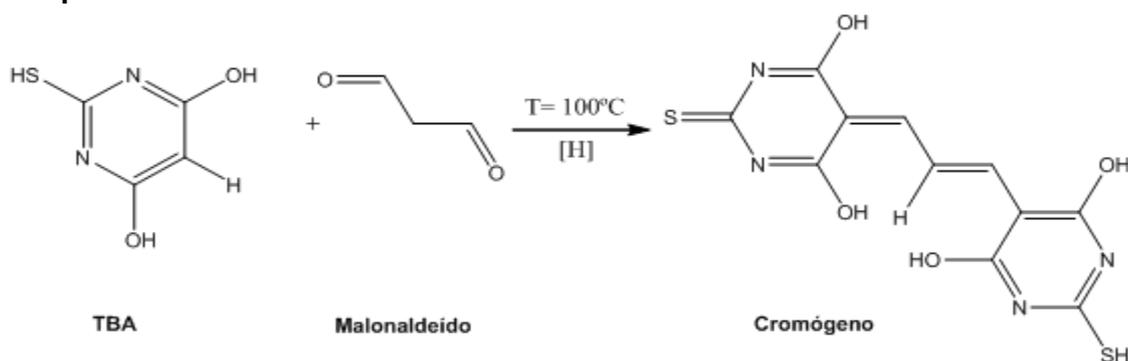


Fonte: autor, 2014.

3.6.2 Peroxidação lipídica, análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Outra técnica para se avaliar a atividade antioxidante é por produtos finais da oxidação como no caso da oxidação de lipídios, o teste mais comum é efetuado através da medição de níveis de malondialdeído (MDA) (Figura7). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos AGPI peroxidados, isto significa que houve uma ruptura endocíclica dos AGPI, com mais de duas duplas ligações, como por exemplo, o ácido linoléico e araquidônico.

Figura 7 – Reação entre malonaldeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) com formação de um cromógeno que apresenta uma coloração rósea intensa em um comprimento de onda de 532nm.



Fonte: autor, 2014.

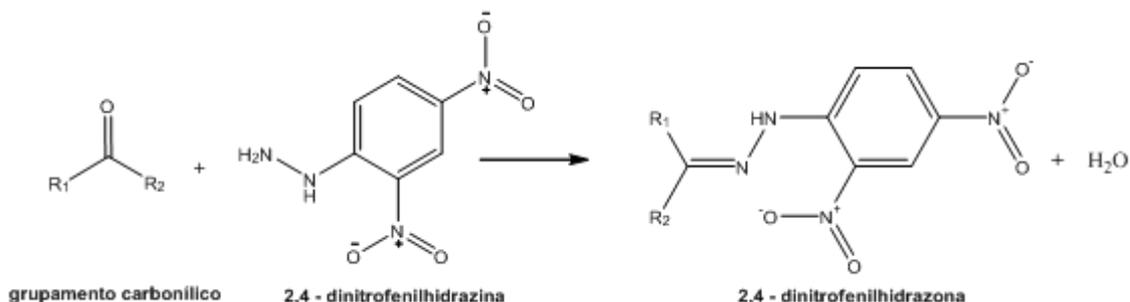
3.6.3 Proteínas carboniladas

Uma das principais mudanças estruturais causadas pelo estresse oxidativo em macromoléculas é a carbonilação de proteínas (VASCONCELOS et al., 2007). O princípio do método para sua determinação é um tipo de oxidação protéica que forma cetonas ou aldeídos reativos que podem reagir com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) para formar hidrazonas. A quantidade formada de hidrazonas das proteínas é quantificada espectrofotometricamente, em absorvância entre 360-385 nm.

A análise de grupos carbonila inseridos em sequências proteicas fornece um confiável marcador de danos oxidativos (CODOÑER-FRANCH et al., 2011).

Sua leitura é mensurada pela absorvância a 412 nm na região do ultravioleta em espectrofotômetro (Figura 8).

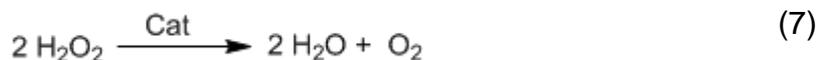
Figura 8 – Reação entre grupamentos carbonílicos com 2,4-dinitrofenil-hidrazina para formação de 2,4-difenil-hidrazona e água.



Fonte: autor, 2014.

3.6.4 Catalase (CAT)

A catalase tem o mais alto número de *turnover* conhecido em enzimas: uma molécula de catalase pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio por segundo, tornando-a uma enzima importante para a desintoxicação desta substância. O método de quantificação desta enzima tem como princípio a avaliação da atividade da catalase, que se refere à medida do decaimento do H₂O₂ para a geração de água e oxigênio (Equação 7). Sua leitura é mensurada em espectrofotômetro na região do ultravioleta num comprimento de onda de 240 nm (VASCONCELOS et al., 2007).



3.6.5 Superóxido Dismutase (SOD)

O princípio do método é avaliar a oxidação da adrenalina na presença de oxigênio gasoso, onde a SOD dismutada a ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio que é convertido, na presença de catalase, em água. Em outras palavras consiste na medida da cinética de degradação do radical na presença de SOD e catalase padrão para a obtenção de produtos mais estáveis que são lidos na região do ultravioleta em um comprimento de onda $\lambda=240\text{nm}$ (Equação 8). Desta forma pode-se avaliar, o quanto de produtos estáveis foi convertido na presença desta enzima.

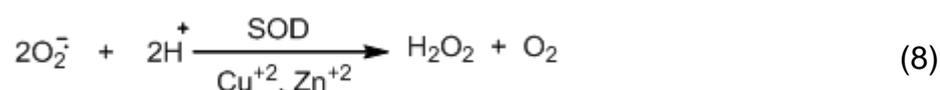
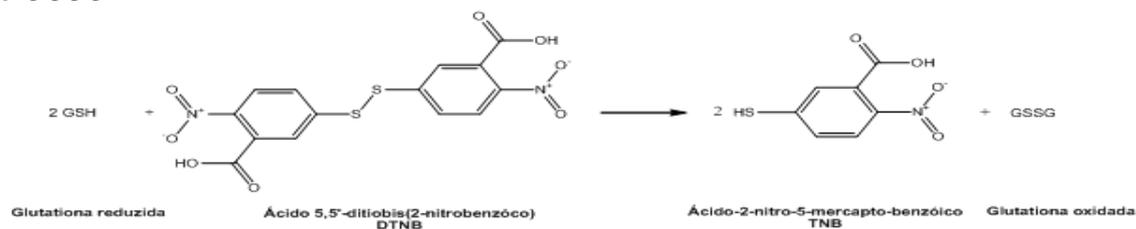


Figura: autor, 2014.

3.6.6 Tiois Totais (SH)

Tiois totais são constituídos por grupamentos protéicos e não protéicos que contém átomos de enxofre que atuam em vários processos biológicos. A glutathione redutase é uma flavoproteína dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses e é a enzima necessária para manter a glutathione em sua forma reduzida e para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A restauração do GSH por GR é uma etapa essencial para a integridade do sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo. O princípio de método é de quantificar os tiois totais na presença de DTNB formando assim adutos de glutathione (Figura 9)(VASCONCELOS et al., 2007).

Figura 9 – Reação entre glutatona reduzida (GSH) com ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) para a formação de ácido-2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB) e GSSG.



Fonte: autor, 2014.

Com base nestas informações descritas na literatura, o estudo em questão desenvolveu por meio de manipulação da dieta proposta pelo Instituto Americano de Nutrição, um modelo animal de DFGNA, com diferentes graus de acometimento hepático. Com o modelo proposto, avaliou-se, por meio da quantificação de alguns marcadores do EO, a interação entre a DFGNA e a EO decorrente das modificações dietéticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

Reagentes

Os reagentes: Albumina bovina sérica (PTn), Epinefrina, Tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Ácido 5,5'-bisdinitro-2-nitrobenzóico(DTNB), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), Catalase, Reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) foram adquiridos da Sigma Aldrich; Ácido clorídrico (HCl) e Acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), Cronoline Química Fina; Ácido tiobarbitúrico (TBA), J.T. Baker; Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Hidróxido de sódio (NaOH), Etanol($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) da Vetec; Ácido tricloroacético 25% (TCA) e Ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), Dinâmica reagentes finos; Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da Synth.

Equipamentos

Agitador magnético AP 55, Phoenix, Biofreezer VIP Serie Sanyo, Espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific, microscópio óptico (Nikon 600N) acoplado a uma máquina digital Nikon 4500.

4.2 Métodos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número 006549/2011-10, baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal – UNESCO - 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

4.2.1 Animais de experimentação e tratamento dietético

Quarenta ratos machos *Wistar*, depois do desmame aos 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais no Biotério Setorial da FANUT ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; ciclo claro/escuro

de 12 h). Os animais foram subdivididos em grupos ($n = 10$) e submetidos a diferentes dietas. O grupo controle (Cont) recebeu a dieta comercial Nuvilab® (Tabela 3). O grupo padrão (Pad) recebeu a dieta do *American Institute of Nutrition* (AIN) (REEVES; SUPPL, 1997). Os grupos testes receberam dietas modificadas a partir da AIN 93, de maneira a promover a doença do fígado gorduroso não alcoólico (DFGNA): grupo deficiente em colina (DC) e grupo deficiente em cistina e colina (DCC). Todos os grupos receberam as dietas na forma peletizada (Figura 10). O conteúdo de sacarose da dieta original (10%) foi substituído por amido de milho. A dieta foi fornecida pela RHOSTER Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, Brasil) (Tabela 4).

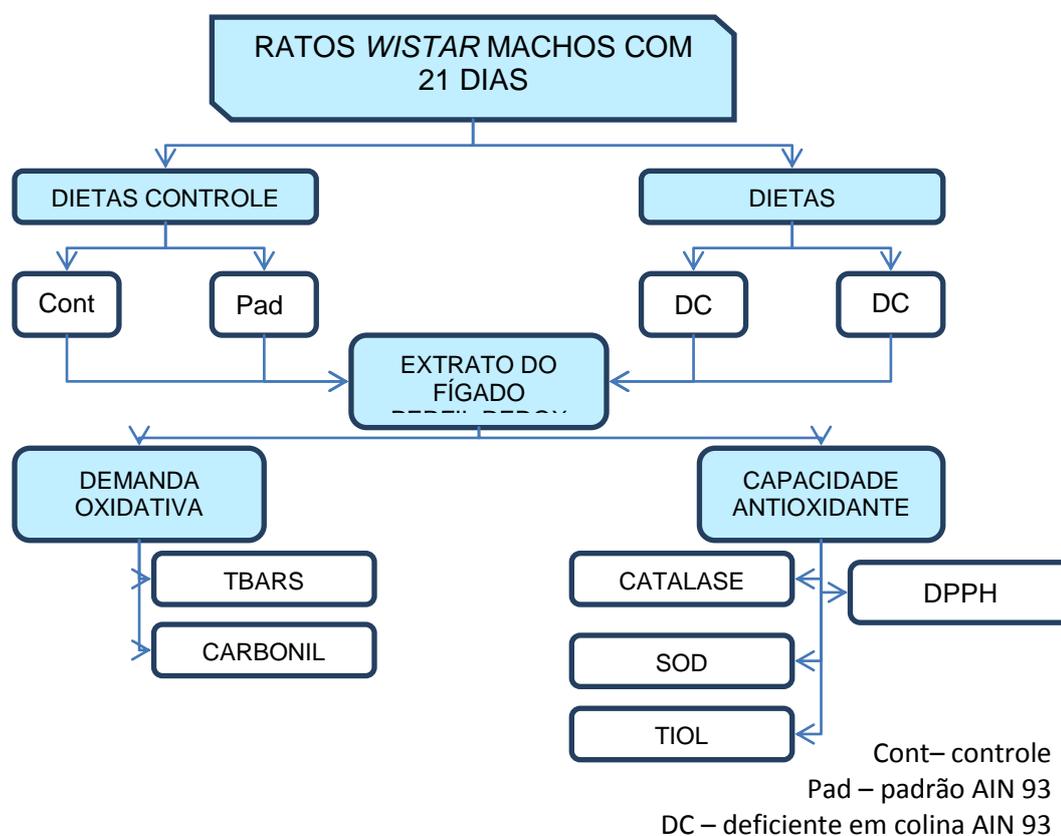
Tabela 3 – Composição da dieta comercial Nuvilab®

COMPOSIÇÃO	
Total de energia (Kcal/kg)▲	3000
Proteína (%)●	29,3
Carboidratos (%)●	57,2
Lipídios (%)●	13,5
Umidade (máx)	12,5%
Proteína Bruta (min)	22,0%
Extrato Etéreo (min)	4,5%
Matéria Mineral (máx)	10,0%
Matéria Fibrosa (máx)	8,0%
Cálcio (máx)	1,4%
Fósforo (min)	0,8%
Lisina	100,0mg
Metionina	300,0mg
Antioxidante	100,0mg

Fonte: autor, 2014.

Notas: ▲ Estimado conforme Atwater e Bryant (1900), ● Percentual do total de energia

Figura 10 – Diagrama do delineamento experimental.



Fonte: autor, 2014.

Notas: os animais foram distribuídos, de acordo com a dieta nos grupos: Controle (Cont), Padrão (Pad); deficientes em colina (DC); deficientes em colina e cistina (DCC). Os modelos dietéticos foram formulados a partir da dieta padrão do *American Institute of Nutrition* na versão 93G. A dieta comercial (Cont) foi adquirida da empresa Nuvilab®.

Tabela 4 – Composição da dieta AIN-93 nas versões Padrão (Pad), Deficiente em Colina (DC) e Deficiente em Colina e Cistina (DCC).

COMPOSIÇÃO	P	DC	DCC
Total de energia (Kcal/kg) [*]	3.719	3.719	3.719
Proteína (%) [‡]	12,8	12,8	12,8
Carboidratos (%) [‡]	77,5	77,5	77,5
Lipídios (%) [‡]	9,7	9,7	9,7
Caseína (>85% proteína; g/kg)	140	140	140
Amido de milho (g/kg)	565,70	565,70	565,70
Amido dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos; g/kg)	155	155	155
Óleo de soja (g/kg)	40	40	40
Celulose microcristalina (g/kg)	50	50	50
Mistura mineral AIN-93 M (g/kg)	35	35	35
Mistura vitamínica (g/kg)	10	10	10
L-Cistina (g/kg)	1,8	1,8	-
Bitartarato de colina (41,1% colina; g/kg)	2,5	-	-
<i>t</i> -Butilidroquinona(g/kg)	0,008	0,008	0,008

Fonte: autor, 2014.

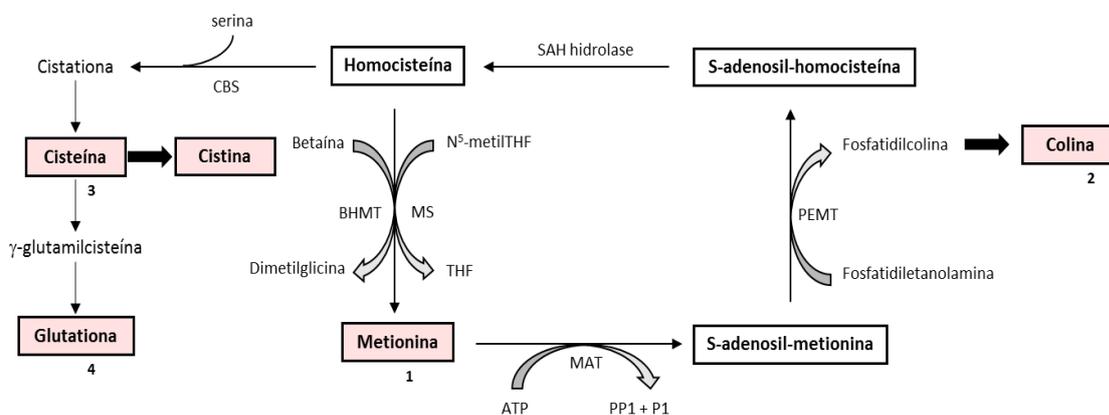
Notas: ▲ Estimado conforme Atwater e Bryant (1900), ● Percentual do total de energia

A dieta AIN-93 possui duas formulações, uma para crescimento (versão G- *growth*) e outra para manutenção (versão M- *maintenance*). Estas composições possuem caseína como proteína de escolha, a qual é insuficiente em fatores

lipotróficos para alimentação destes animais. Por isso são adicionadas colina e cistina e/ou metionina às versões originais, de acordo com a dieta G ou M (REEVES; SUPPL, 1997). Neste estudo foi utilizada a dieta na versão M, pela menor quantidade de caseína e cistina, sem metionina suplementar (adicionada à versão G), pois visou trabalho prioritariamente à indução do quadro de esteatose hepática. Sabendo que a versão de escolha não foi a apropriada para o crescimento normal dos animais por se tratar de uma composição para animais adultos e deficientes em fatores lipotróficos para a idade do animal, foi introduzido ao estudo, um grupo controle, alimentado com dieta comercial padrão.

A cistina é um aminoácido formado pela dimerização oxidativa da cisteína, a qual tem como precursor a metionina. Na deficiência de cistina, portanto, mais metionina será utilizada para repor a carência de cisteína, ocasionando deficiência conjunta na produção de outros compostos dependentes de metionina, como a colina e a glutatona (Figura 11), resultando em esteatose hepática e estresse oxidativo, pela falha na produção de glutatona.

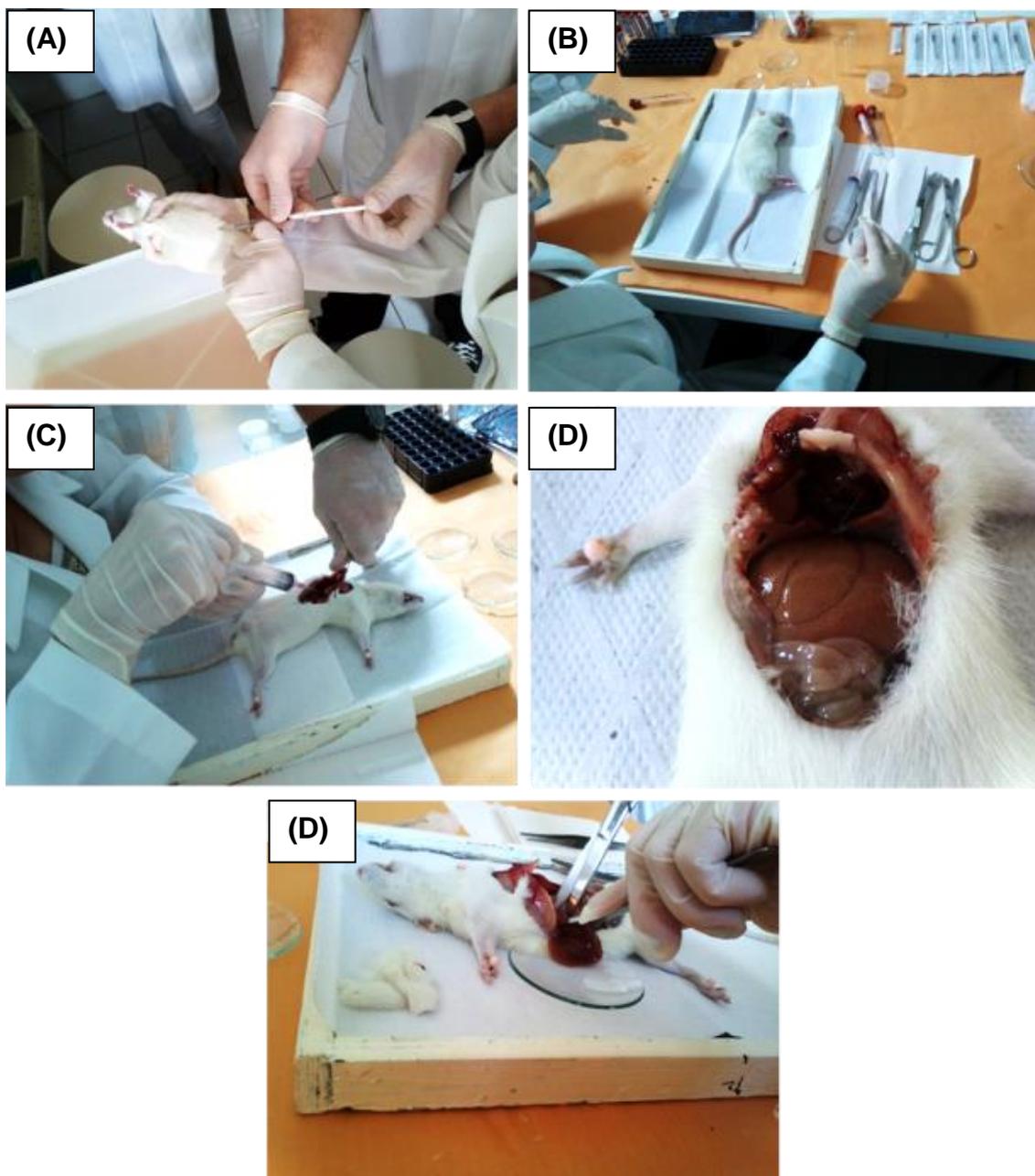
Figura 11 – Via metabólica da Metionina.



Nota: ATP, Trifosfato de adenosina; MAT, Metionina adenosiltransferase; SAME, S-adenosil-metionina; PEMT, Fosfatidiletanolamina - N- metiltransferase; SAH hidrolase, S-adenosil-homocisteína hidrolase; N5- metilTHF, N5- metiltetraidrofolato; THF, tetraidrofolato; MS, Metionina sintase; BHMT, Betaína-homocisteína metiltransferase; PLP, Piridoxal 5'-fosfato; CBS, Cistationina β -sintase.

Os animais tiveram livre acesso à ração e à água durante os trinta dias do experimento. A ingestão dietética e o peso dos animais foram registrados semanalmente no mesmo dia e no período da manhã. Durante todo o experimento foram seguidos os cuidados propostos pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996). Ao final do período experimental, procedeu-se o sacrifício no qual os animais foram mantidos em jejum por 12 h que antecede ao sacrifício, em seguida foram pesados e anestesiados (Figura 12) para posterior abertura do tórax, com um corte longitudinal auxiliado por um bisturi e tesoura cirúrgica, posteriormente, proceder-se à coleta de sangue por punção cardíaca e logo em seguida a retirada do fígado, rins e parte do intestino. Após a coleta, centrifugaram-se as amostras de sangue (3500 x g por 20 min, para a obtenção do soro). Para as análises histológicas, fragmentos do lóbulo esquerdo do fígado foram imersos em formol a 10%, para fixação. As porções remanescentes foram armazenadas a -80 °C para as análises bioquímicas. Imediatamente antes das análises, o órgão foi homogeneizado em PBS 10 mmolL⁻¹ coma parelho Potter-ElvDHCj e centrifugado (10.000x g, 10 min a 4°C) para remover restos celulares. Os sobrenadantes foram utilizados para todos os ensaios bioquímicos. A proteína tecidual foi quantificada utilizando o método de Lowry(LORENZI et al., 2011; LOWRY et al., 1951).

Figura 12 – Sacrifício dos animais no trigésimo (30º) dia de experimento.



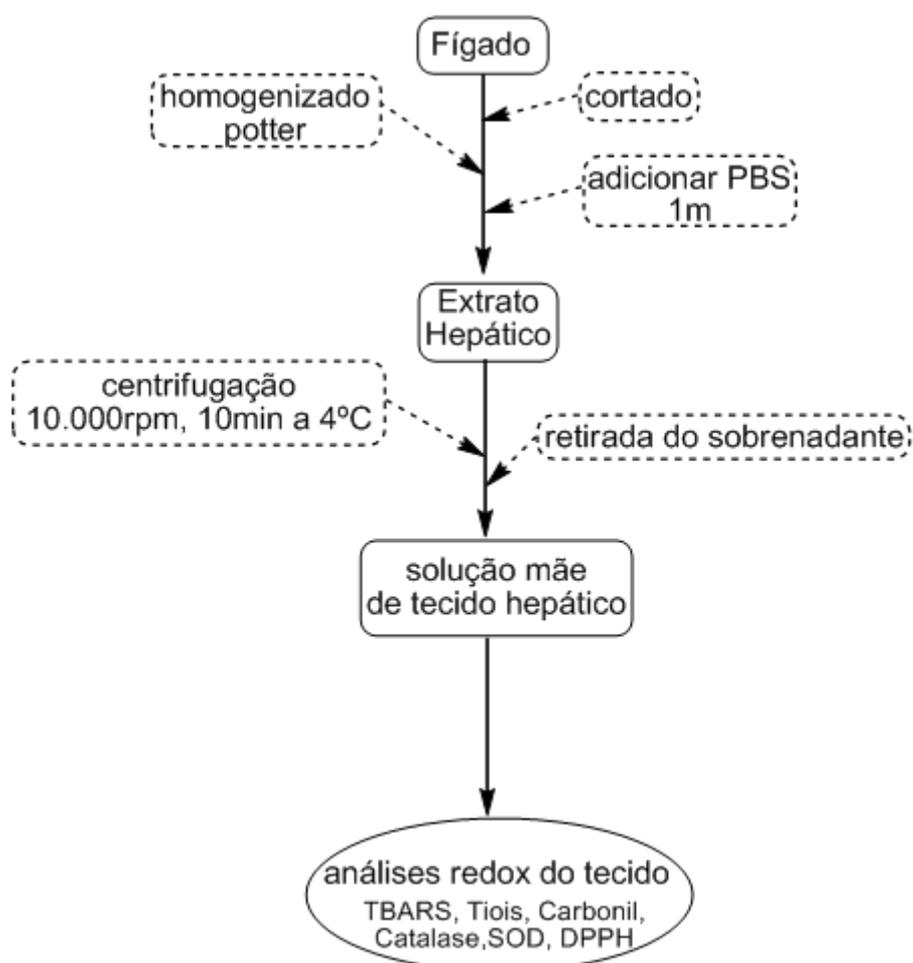
Fonte: autor, 2014.

Notas: os animais foram anestesiados (A), para em seguida abertura do tórax (B), retirada do sangue por punção cardíaca (C) e posterior retirada dos órgãos(D).

4.2.2 Preparo da amostra do tecido hepático

As amostras de fígado foram cortadas, com o auxílio de um bisturi, em pedaços de aproximadamente 1g de fígado bruto. Em seguida, colocou-se o fígado em um macerador potter e em seguida adicionou-se 1mL de tampão fosfato (pH 7,4). O extrato obtido foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4 °C, centrifugando-se duas vezes para a obtenção de um sobrenadante homogêneo e parcialmente translúcido à luz; posteriormente, o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer -80°C, para análises de proteína, TBARS, tiois totais, proteínas carboniladas, catalase, SOD e DPPH (Figura 13).

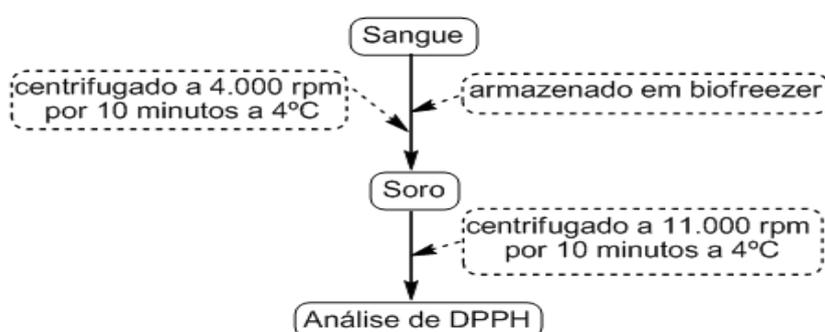
Figura 13 – Fluxograma experimental do tratamento dado ao tecido hepático para realização das análises do perfil redox.



4.2.3 Preparo da amostra de sangue

As amostras de sangue foram retiradas por punção cardíaca e armazenadas em eppendorf e, em seguida, acondicionadas em nitrogênio líquido até o armazenamento em biofreezer. Em seguida, centrifugou-se novamente para se obter um soro mais límpido para posterior análise das substâncias protetoras frente ao radical (DPPH*) (Figura 14).

Figura 14 – Fluxograma do tratamento do sangue, após o sacrifício até a análise da atividade antioxidante total.



Fonte: autor, 2014.

4.2.4 Dosagem de proteína pelo método de Lowry

Foram realizadas diluições do extrato do fígado para concentrações que consistiam em uma parte de extrato para 60 partes de tampão fosfato 1:60, e em seguida adicionado 1 mL de uma mistura contendo carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 2%, em hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de cobre (CuSO_4) a 1% e tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). O preparado foi agitado em vórtex e incubado por 15 min. Em seguida adicionaram-se 100 μL de reagente de Folin-Ciocalteu a (1:1), em água destilada usando o vórtex para homogeneizar. Após incubação por 20 minutos, foram adicionados 200 μL desse meio nos poços de placa UV/Vis para realização de leitura em 750 nm. Nessa mesma placa, foi feita a curva padrão de albumina sérica bovina (ABS), utilizada para a determinação da

concentração dessa proteína. Todas as amostras foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em mg mL^{-1} de solução (ZAIA, 1998).

4.2.5 Análises para avaliação do estresse oxidativo

4.2.5.1 Tiois reduzidos totais

As amostras de extrato hepático foram diluídas com PBS, até um volume de 1 mL, para uma concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, de forma a ter 50 μg de proteína presente em solução, seguida de agitação em vórtex e posterior retirada de 25 μL da solução, completando-se com 140 μL de tampão fosfato dibásico PBS 10 mmol L^{-1} (pH 7), 35 μL de tampão contendo 100 mmol L^{-1} de ácido bórico e 0,2 mmol L^{-1} de EDTA, obtendo-se o valor de pH de 8,5 ao final do preparo desta solução. Adicionou-se, a seguir, 10 μL de ácido 5,5'-bisdinitro-2-nitrobenzóico (DTNB). A reação entre compostos tiólicos com DTNB, a $0,01 \text{mol L}^{-1}$, levou a uma intensa cor amarela após o tempo de incubação de 1 h à temperatura ambiente, para então ser lido em $\lambda = 412 \text{ nm}$. Preparou-se o branco simultaneamente, exceto pela adição de DTNB. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Calculou-se o conteúdo tiólico usando a equação 9 abaixo (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em mol SH por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de tiois:

$$\text{MolSH} = \frac{(\text{ABS}_c/\text{DTNB}) - (\text{ABS}_s/\text{DTNB}) \times 0,00021}{9,434} \quad (9)$$

0,00021 = coeficiente de extinção molar do DTNB;

ABS_c/DTNB = absorvância com DTNB;

ABS_s/DTNB = absorvância sem DTNB.

4.2.5.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de TBARS é amplamente utilizado para determinação de produtos de peroxidação lipídica, pela formação de cromôgenos entre o TBA e o MDA, em uma proporção de (2:1). Foram retirados 200µL do extrato de fígado e colocados em um eppendorf com 184 µL de TCA 12%. Em seguida, agitou-se em vórtex para então centrifugar por 10 min a 10.000 g a 4°C, para, em seguida retirar 100µL de sobrenadante, colocando-se em um novo eppendorf, para então adicionar 200µL de TBA 0,67% a quente (DRAPER et al., 1990). Aqueceu-se em banho-maria, por 30 min. a uma temperatura de 100°C. Posteriormente, pipetou-se em placa e leu-se em um comprimento de onda de $\lambda = 532$ nm. Obtiveram-se as concentrações de MDA a partir de uma curva de calibração realizada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano como solução padrão, submetido ao mesmo tratamento aplicado aos sobrenadantes das amostras. Os resultados foram expressos em mmol de MDA por mg de proteínas.

Cálculo para a concentração de produtos de peroxidação lipídica:

$$\text{mmol de MDA / mg de PT}_n = \frac{X}{\left(\frac{M_{PT_n}}{V_{PT_n}} \times 100\right) \times 1000} \quad (10)$$

X= concentração retirada da equação da reta;

M_{PT_n} = massa de proteína no eppendorf;

V_{PT_n} = volume de proteína;

100= volume da amostra colocada em placa;

1000= conversão de µg para mg.

4.2.5.3 Proteínas carboniladas

O dano oxidativo a proteínas carboniladas como aldeídos e cetonas, foi mensurado pela quantificação de grupos carbonila baseada na reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH).

Preparou-se a amostra para conter cerca de 1 mg de proteína presente na solução, tanto no eppendorf com DNPH como no eppendorf com o branco. Em seguida, completou-se o volume para 200 μL quando necessário com PBS, adicionou-se a solução, 100 μL de TCA para precipitação das proteínas, sendo que ao final do preparo da solução esta deverá conter 10% de TCA presente no eppendorf, agitou-se em vórtex e repousou-se em gelo por 5 min, para então centrifugar por 5 min a 6.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense com 100 μL de NaOH a 0,2 M, em vórtex. Nos eppendorfs com amostra foram adicionados 100 μL de DTNB 10 mM e ao branco 100 μL de HCl 2M para, em seguida agitar-se em vórtex. Incubou-se por 1 h, agitando-se em vórtex de 15 em 15 min, posteriormente adicionou-se 100 μL de TCA 20% e centrifugou-se por 10 min a 10.000 g. Os pellets formados foram lavados 3 vezes, com 500 μL de etanol/acetato de etila (1:1), centrifugou-se a 10.000 g por 10 min para então descartar-se o sobrenadante. Os pellets foram ressuspensos com 1 mL de uréia 8 M com pH 2,3, centrifugou-se por 10 min a 10.000 g para remoção de qualquer material insolúvel, transferiram-se 200 μL da solução para a placa, todas as amostras feitas em triplicata, onde se leu em um comprimento de onda $\lambda = 370$ nm (LEVINE et al., 1994). Os resultados foram expressos em nmol de carbonila por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de carbonil:

$$\text{nmol de carbonil/mg de PTn} = \frac{(\text{ABS}) \times 0,2 \times 5 \times 1000}{22 \times 0,67 \times \text{cm}} \quad (11)$$

ABS = (Absorbância Tubo DNPH - Absorbância Tubo Branco);

Coeficiente de extinção (DNPH) = 22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

0,67 = distância do caminho óptico da placa (cm);

0,2 = volume (mL) usado na leitura da placa;

1000 = conversão em nmol de carbonil;

5 = razão do volume de proteína em uréia (1000 µL) e o usado para ler na cubeta (200 µL). Ou seja, $1000/200 = 5$;

m = massa de proteína em mg usada no poço.

4.2.6 Ensaio das atividades enzimáticas

4.2.6.1 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi medida segundo Patonet al., 2009, como descrito previamente por AEBI (1984). A taxa de redução na absorvância a 240 nm foi utilizada como índice de decomposição do H₂O₂ por catalase. Uma unidade de catalase (CAT) foi considerada como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 µmol min⁻¹ H₂O₂ a 25 °C. Adicionaram-se 7,5 µL de extrato, com concentração de 2 µg µL⁻¹, 187,5 µL de tampão fosfato, ao branco adicionaram-se 7,5 µL de H₂O destilada mais 187,5 µL de tampão fosfato, posteriormente 5 µL de H₂O₂ aos poços e fez-se a leitura de 15 em 15 s. durante 5 min com um comprimento de onda de λ= 240 nm. Todas as amostras foram feitas em quintuplicatas e os resultados foram expressos em U de catalase por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de catalase:

$$\text{catalase U/mg de PTn} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (\text{ABS i} - \text{ABS f})}{(\text{ABS i}) \times \text{mg de PTn}} \quad (12)$$

ABS i = Absorbância inicial;

ABS f = Absorbância final;

0,67 = fator de correção do método da cubeta em relação à placa, caminho óptico;

mg proteína = quantidade de proteína (em mg) pipetada no poço.

4.2.6.2 Superóxido dismutase (SOD)

O método se baseou na oxidação da adrenalina pela enzima superóxido dismutase (SOD) presente na amostra biológica. Preparou-se 1 mL de catalase a $10 \mu\text{molL}^{-1}$, a função da catalase é reduzir o H_2O_2 , formado como produto da SOD, em H_2O e O_2 . No poço, pipetaram-se $5 \mu\text{L}$ de solução de catalase mais $7,5 \mu\text{L}$ de amostra, com concentração aproximada de $2 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, resultando em $15 \mu\text{g}$ de proteína presente no poço. Adicionaram-se $182,5 \mu\text{L}$ de tampão glicina (pH 10,2), contendo um volume total de $195 \mu\text{L}$ no poço, foi feita a leitura desta solução, como branco, com um comprimento de onda de $\lambda = 480 \text{ nm}$. Em seguida foram adicionados $5 \mu\text{L}$ de adrenalina (epinefrina) e novamente foi feita a leitura da cinética reacional de 15 em 15 s durante 15 min. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de SOD:

$$U \text{ SOD}/\text{mg PTn} = \frac{1000}{X \times C. \text{PTn}} \quad (13)$$

1000= fator de conversão para mg de SOD;

X= valor do produto das regressões lineares;

C. PTn= concentração de proteína.

4.2.6.3 Análise da atividade sequestrante frente ao DPPH

Este método avalia o descoramento através da captura do radical DPPH por substâncias protetoras presentes na amostra. A capacidade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi descrita por BRAND-WILLIAMS et al. (1995). Diluiu-se o extrato hepático 1:80 com tampão PBS (pH 7), aguardou-se 24 h para a formação de precipitado, em freezer, e retirou-se desta solução $200 \mu\text{L}$ do sobrenadante para então ser adicionado em um eppendorf. Em relação ao soro sanguíneo, retiraram-se $200 \mu\text{L}$ da solução contendo o extrato bruto, adicionaram-se $750 \mu\text{L}$ de DPPH, após um tempo de 30 min de incubação à temperatura ambiente, para então serem retirados $200 \mu\text{L}$ desta solução e

colocados nos poços de microplaca, todas as amostras foram feitas em triplicata e lidas em um comprimento de onda de $\lambda = 517$ nm, os resultados expressos em termos percentuais de descoloramento da solução (%).

Cálculo para a o percentual de descoloramento do radical DPPH:

$$\% \text{ DPPH descoloramento} = \frac{(\text{DPPHr})_a}{(\text{DPPHr})_b} \times 100 \quad (14)$$

$(\text{DPPHr})_a$ = concentração de DPPH remanescente da amostra;

$(\text{DPPHr})_b$ = branco preparado com metanol.

4.2.7 Análise histológica do fígado

Após fixação em formol a 10%, o órgão foi lavado em água destilada, clivado, adotando-se cortes transversais, desidratado em concentrações crescentes de álcool e incluído em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos num micrótomo rotativo (Leica RM 2135) e efetuada a sua coloração em hematoxilina-eosina (H&E), para a elaboração das lâminas histológicas. Foram também feitas colorações específicas para permitir a identificação e caracterização de certas alterações ou lesões hepáticas, nomeadamente, à coloração de Perls e Pas (*Periodic Acid Schiff*). A observação e a análise histopatológica do tecido hepático foram realizadas em microscópio óptico (Nikon 600N) ao qual está acoplada uma máquina digital Nikon 4500. A avaliação histológica foi feita, sempre, pelo mesmo patologista. Os parâmetros histológicos utilizados para avaliar a amostra foram: esteatoses macrovesicular e microvesicular, o infiltrado inflamatório e a injúria hepatocelular, caracterizada pela balonização dos hepatócitos e pelos hialinos de Mallory. A presença ou ausência de colestase ou a deposição de ferro também foram avaliadas, assim como a presença de vacuolização glicogênica e da metaplasia ductular. A fibrose foi analisada quanto ao seu padrão de deposição e a sua intensidade. O dano hepatocelular foi classificado em: leve, levemente moderada, moderada e grave (SANTOS et al., 2013).

4.2.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados, após verificação dos pressupostos para análise paramétrica, através de análise de variância (ANOVA) e teste F de Snedecor. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Utilizou-se a correlação de Pearson para avaliação das correlações das diversas variáveis intra grupo. Assumiu-se a significância quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

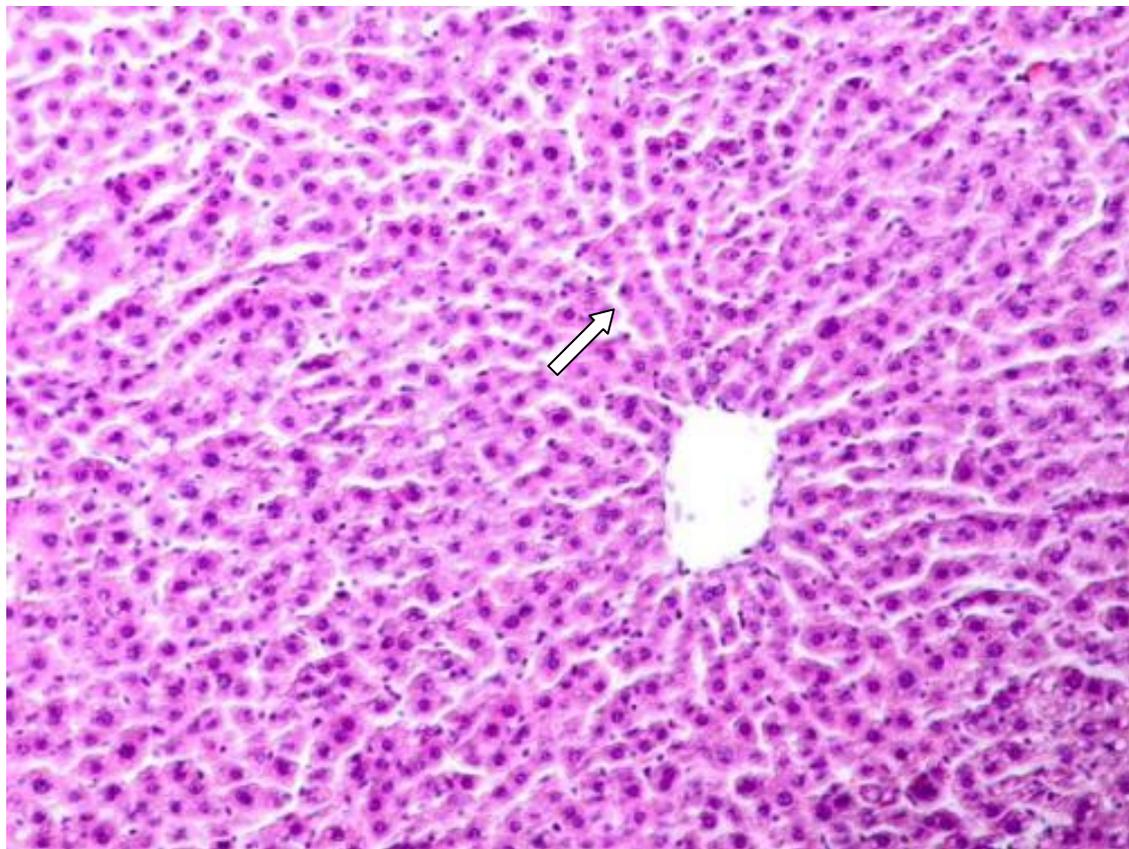
5.1 Análises histológicas

A partir dos resultados e discussão utilizou-se a sigla DCM/DCC quando apontado o uso de dietas deficientes em colina e cistina ou metionina. Na literatura, há um grande número de composições indutoras de esteatose hepática e, boa parte dos trabalhos, utiliza a metionina como aminoácido deficiente, por isso quando for necessário citá-los em comparação aos estudos, desta forma para facilitar a compreensão do leitor.

As figuras a seguir (Figs. 15-16-17-18) estão relacionadas aos cortes histológicos do fígado, obtidos nos diferentes tratamentos.

A histologia mostrou que o tecido hepático dos animais alimentados com as dietas AIN-93, não apresentaram desalinhamento dos cordões hepáticos nem formação de vacúolos de gordura (Figura 15); já os animais dos grupos Pad apresentaram esteatose hepática leve, com desorganização dos cordões hepáticos próxima à região periportal (Figura 16). Os animais do grupo DC apresentaram intensa esteatose hepática, independente da zona avaliada, desorganização dos cordões hepáticos em todo o corte tecidual, hepatócitos balonizados, infiltrados inflamatórios, morte celular e indícios de fibrose (Figura 17). Para os animais do grupo DCC encontrou-se desorganização dos cordões hepáticos similar ao grupo DC, hepatócitos com aumento de tamanho dos núcleos e desestruturação destes, corpúsculos de *Mallory* e morte celular; com ausência de hepatócitos balonizados ou infiltrado inflamatório (Figura 18).

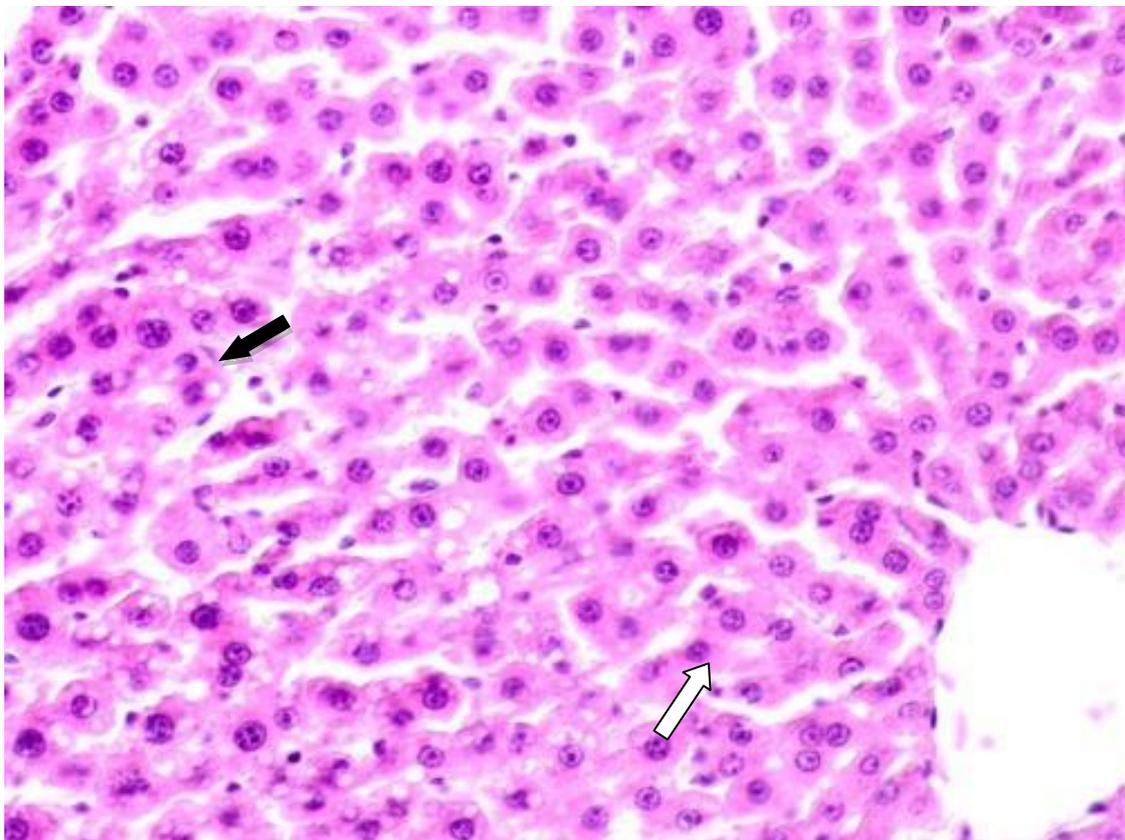
Figura 15 – Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo Padrão AIN 93. Aumento 20x.



Fonte: autor, 2014.

Notas: A seta branca mostra a manutenção de todas as estruturas celulares e sem desalinhamento dos cordões hepáticos nas análises histológicas, nos animais do grupo Cont.

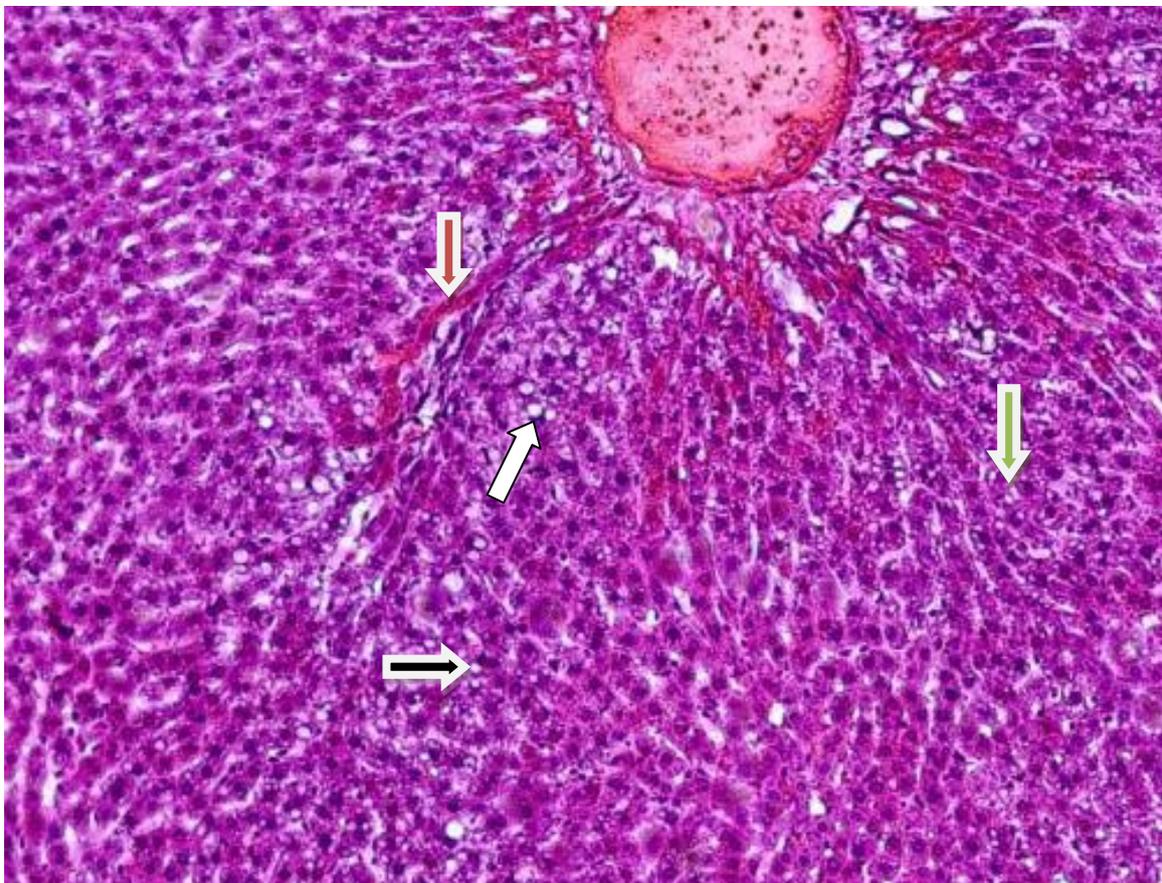
Figura 16 – Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo Padrão AIN 93. Aumento 30x.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Seta branca: Início de desalinhamento dos cordões hepáticos, seta preta: formação de microvacúolos de gordura.

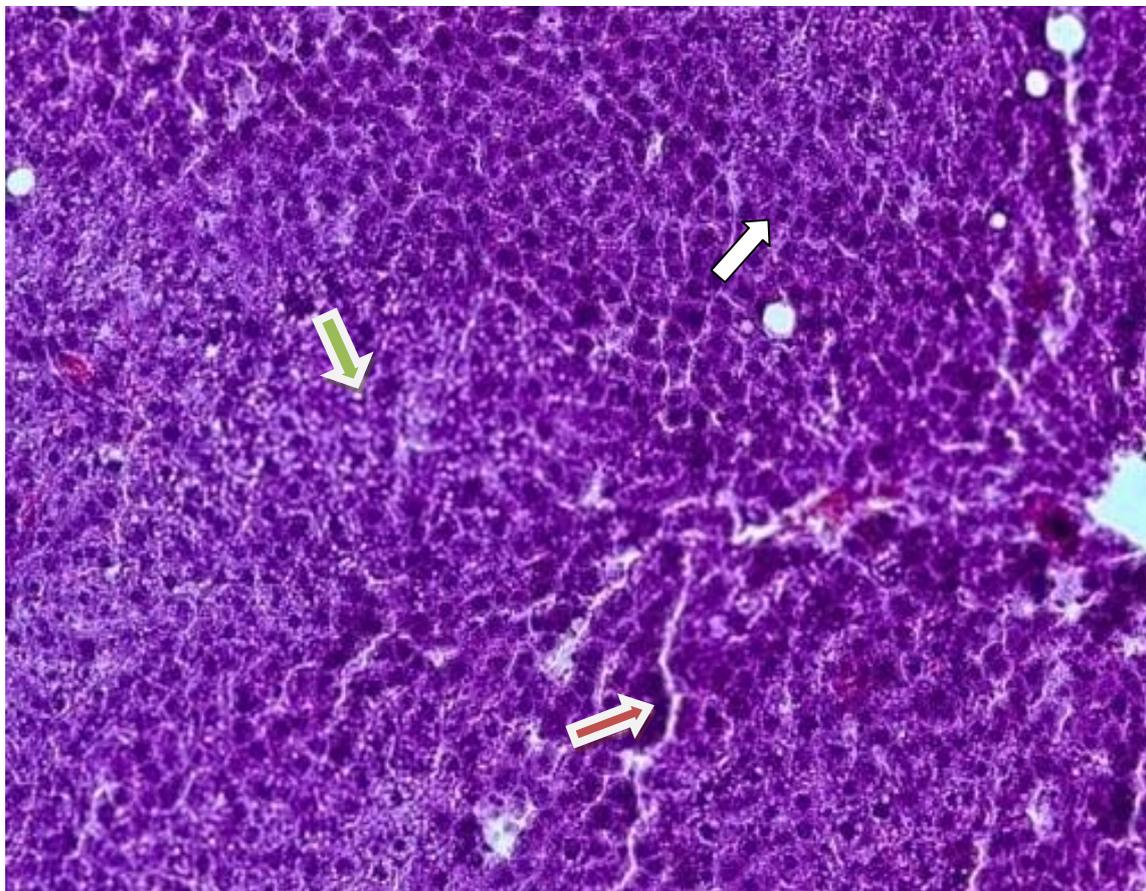
Figura 17 – Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo deficiente em colina AIN 93. Aumento 20x.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Seta branca: macrovacúolos de gordura com deslocamento do núcleo para a periferia da célula, seta verde: prevalência do desalinhamento dos cordões hepáticos, seta preta: microvacúolos de gordura, seta vermelha: aglomerado de massa celular.

Figura 18 – Corte histológico do fígado corado pelo método HE grupo deficiente em colina e cistina AIN 93. Aumento 20x.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Seta branca: desalinhamento dos cordões hepáticos, seta verde: diminuição dos microvacúolos, seta vermelha: corpúsculos enegrecidos aglomerados (possível processo necrótico).

5.2 Peso dos animais e ingestão dietética

Para avaliação do processo de evolução dos animais submetidos a diferentes modelos dietéticos durante o período de experimento, o peso e a ingestão dietética foram coletados semanalmente. A ingestão alimentar dos animais não diferiu entre os grupos ($p \geq 0,05$). O peso corporal final dos animais também não diferiu entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Tabela 5 – Peso corporal final (PCF), peso absoluto do fígado (PAF) e peso relativo do fígado (PRF) nos diferentes modelos dietéticos.

VARIÁVEIS	GRUPOS $n=1$			
	*CONT	°°Pad	*°°DC	**°°DCC
PCF (g)	170,25±11,46 ^a	189,97±18,49	185,87±18,00 ^a	175,92±16,90 ^a
PAF (g)	6,69±0,36 ^a	7,64±1,05 ^a	7,64±0,88 ^a	7,41±0,69 ^a
PRF	0,03±0,002 ^a	0,04±0,002 ^a	0,04±0,003 ^a	0,04±0,002 ^a

Notas: Valores médios \pm desvios-padrão. Valores seguidos pelo menos uma mesma letra na linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey-*HSD*. *CONT- Controle (dieta comercial) °°Pad- Padrão, *°°DC- Deficiente em colina, **°°DCC- Deficiente em colina e metionina (formuladas a partir da dieta padrão do *American Institute of Nutrition* na versão 93)

Os animais de todos os grupos incluindo o Cont não apresentaram diferença estatística em relação à desnutrição ou perda de peso, isso possivelmente por que o período experimental foi apenas de 30 dias, sendo insuficiente para a instalação da perda de peso e/ou desnutrição, comum em modelos animais DCM. Os pesos absolutos e relativos do fígado dos animais não diferiram ($p \geq 0,05$; Tabela 6). Observou-se também que a dieta AIN-93 ocasionou DHC em sua formulação padrão. Isto tem sido evidenciado comumente em trabalhos realizados pelo presente grupo de investigação em ratos alimentados com a dieta do *American Institute of Nutrition* (AIN), em diferentes contextos (DE MELO LUCENA et al., 2010; SANTOS et al., 2013), sugerindo problemas em sua composição, possivelmente em relação à proporção de macronutrientes e à

quantidade adicionada de aminoácidos sulfurados e colina, reconhecidos fatores lipotróficos.

Tal observação foi importante na escolha da formulação mais apropriada à indução da DFGNA, com os grupos alimentados com a dieta AIN 93 na formulação padrão já apresentando quadro leve de DHC. Os casos mais graves de esteatose foram induzidos apenas com a retirada de fatores lipotróficos comumente adicionados na formulação da dieta. Os animais do grupo controle não apresentaram DHC.

O uso de dietas DCM para roedores como modelo nutricional na indução da EHNA possui características similares aos da doença em humanos, incluindo dano hepatocelular, inflamação e fibrose (IP et al., 2004; WELTMAN; FARRELL; LIDDLE, 1996). Este tipo de dieta é um modelo nutricional bem estabelecido para a indução de EHNA e amplamente utilizado como modelo comparativo em seres humanos (LEE et al., 2011).

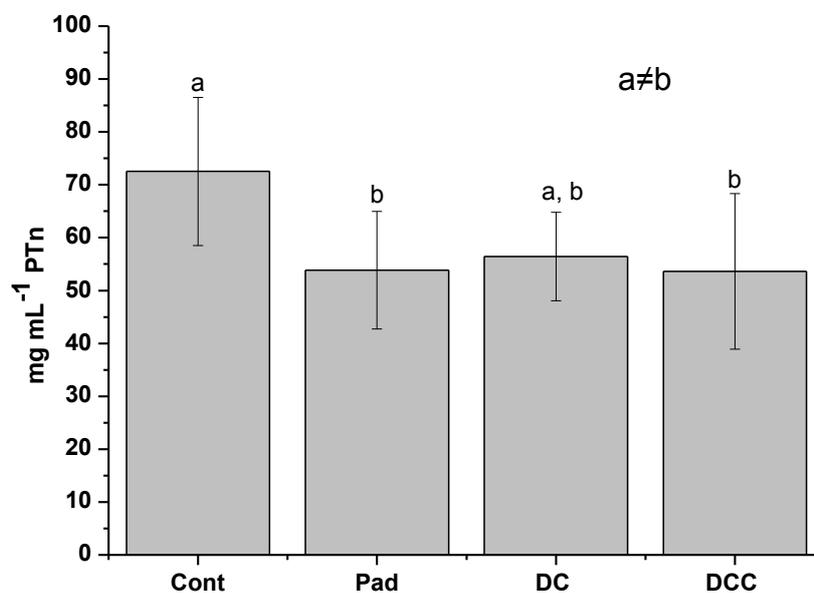
A esteatose induzida por estas dietas ocorre devido à eliminação de fatores lipotróficos, no entanto, o impacto desta dieta na expressão das enzimas hepáticas antioxidantes, através do RNAm, tais como, glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) permanecem desconhecidas (HEBBARD; GEORGE, 2011), assim como o grau de agressão decorrente da peroxidação lipídica e da carbonilação em membranas, enzimas, organelas e DNA celular.

As análises de soro e extrato hepático foram agrupadas de acordo com os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (peroxidação lipídica – MDA, carbonila, DPPH) e análise da defesa antioxidante através da avaliação enzimática da catalase, superóxido dismutase e tiois totais.

5.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada e a figura 19 mostra os resultados obtidos.

Figura 19 – Concentração de proteína em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).



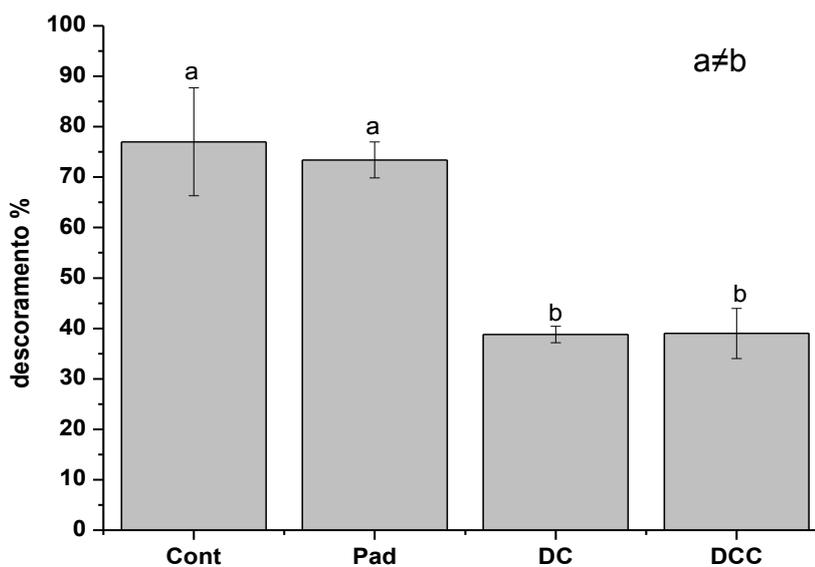
Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração de proteína em mg por mL.

Como pode ser observado, na figura 19, o conteúdo protéico do grupo Cont foi superior aos grupos Pad e ao DCC ($p < 0,05$). O grupo DC foi semelhante ao Cont e aos grupos Pad e DCC.

5.4 Avaliação da capacidade sequestrante de DPPH, em soro

Figura 20– Percentual de descoloramento do DPPH em soro nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Percentual de descoloramento do DPPH (%)

Tabela 6 – Descrição estatística do DPPH do soro hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Erro	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Cont	5	76,2000	11,38859	5,09313	62,0592	90,3408	67,00	93,00
Pad	5	73,4000	3,57771	1,60000	68,9577	77,8423	69,00	77,00
DC	5	38,8000	1,64317	,73485	36,7597	40,8403	36,00	40,00
DCC	5	39,0000	4,94975	2,21359	32,8541	45,1459	31,00	44,00
Total	20	53,5294	18,55416	3,18201	47,0556	60,0033	31,00	93,00

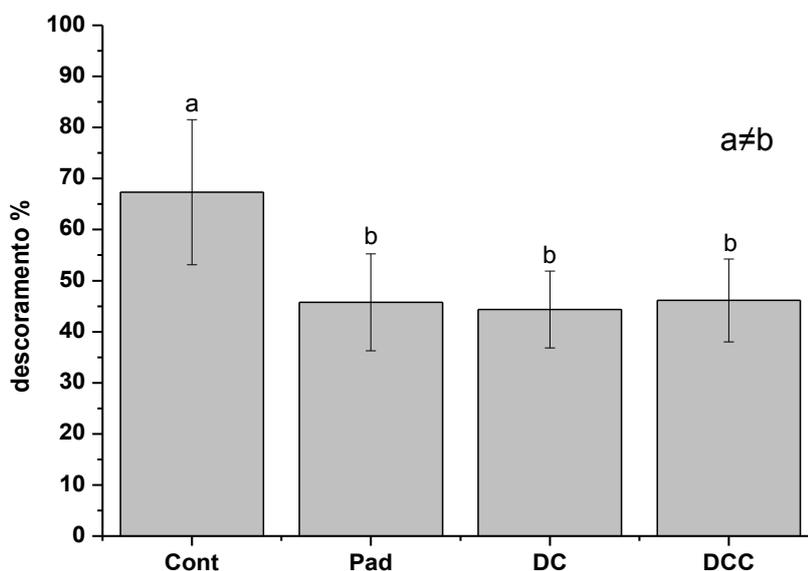
Fonte: autor, 2014.

A capacidade protetora do soro sanguíneo dos animais frente ao DPPH mostrou-se superior no grupo controle (Cont) e semelhante ao grupo padrão

(Pad); entretanto, diferente dos grupos mais deficientes (DC e DCC), cujos valores se mostraram inferiores, mas iguais entre si.

5.5 Avaliação da capacidade sequestrante do DPPH, em extrato

Figura 21– Percentual de descoramento do DPPH em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).



Fonte: autor, 2014.

Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Percentual de descoramento do DPPH (%)

Tabela 7– Descrição estatística do DPPH do extrato hepático nos diferentes grupos.

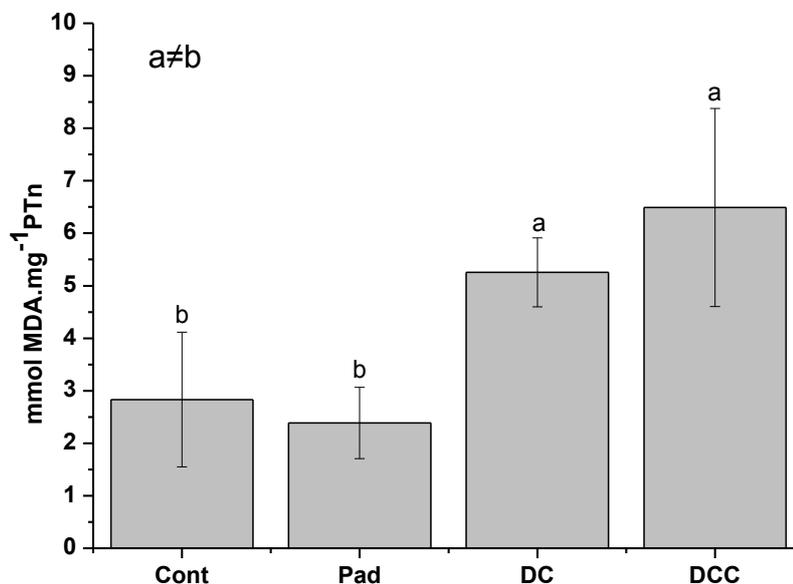
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Erro	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Cont	9	67,3333	14,20387	4,73462	56,4153	78,2514	53,00	94,00
Pad	8	45,7500	9,49812	3,35809	37,8094	53,6906	30,00	59,00
DC	8	44,3750	7,52021	2,65880	38,0879	50,6621	36,00	55,00
DCC	7	46,1429	8,11231	3,06616	38,6402	53,6455	36,00	59,00
Total	32	51,5625	14,10088	2,49271	46,4786	56,6464	30,00	94,00

Fonte: autor. 2014.

Os grupos DC, DCC e Pad mostraram-se estatisticamente iguais, já o Cont atingiu maiores resultados em comparação aos demais grupos.

5.6 Dosagem de Produtos de peroxidação lipídica (TBARS)

Figura 22– Concentração de TBARS em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração em mmol de MDA por mg de proteína (PTn)

Tabela 8 – Descrição estatística de TBARS do extrato hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Cont	8	3,9049	,41259	,14587	3,5599	4,2498	3,12	4,41
Pad	6	2,3860	,68081	,27794	1,6715	3,1005	1,60	3,30
DC	8	5,2534	,65737	,23242	4,7038	5,8029	4,02	5,71
DCC	6	6,4917	1,88605	,76998	4,5124	8,4710	4,09	8,83
Total	28	4,4323	1,89971	,28319	3,8615	5,0030	1,60	8,94

Fonte: autor, 2014.

Observou-se um aumento significativo nas concentrações de MDA nos grupos deficientes em colina (DC) e em colina e cistina (DCC), em relação aos grupos controle e padrão ($p < 0,001$).

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos decorrente da utilização de dietas DC ou DCM aumenta a oferta de substrato energético para reações de oxidação celular mitocondrial. Na utilização desse substrato para fins energéticos ocorre o escape de ânion radical superóxido a partir da cadeia respiratória. O ataque à membrana lipídica acontece quando uma espécie radicalar é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-) da molécula, portanto, é comum seu aumento em fígados gordurosos e embora o mecanismo da progressão da doença permaneça pouco compreendido, o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da DHNA. (CHEUNG; LEE; RAMAN, 2012; LARTER et al., 2008; SANTOS et al., 2013; VETELÄINEN; VAN VLIET; VAN GULIK, 2007), avaliaram o estresse oxidativo de animais alimentados com dietas DCM e observaram dano aumentado, com aumento de MDA. Resultados similares foram encontrados em nosso trabalho com níveis mais elevados de peroxidação nos grupos de animais deficientes (DC e DCC) figura 22.

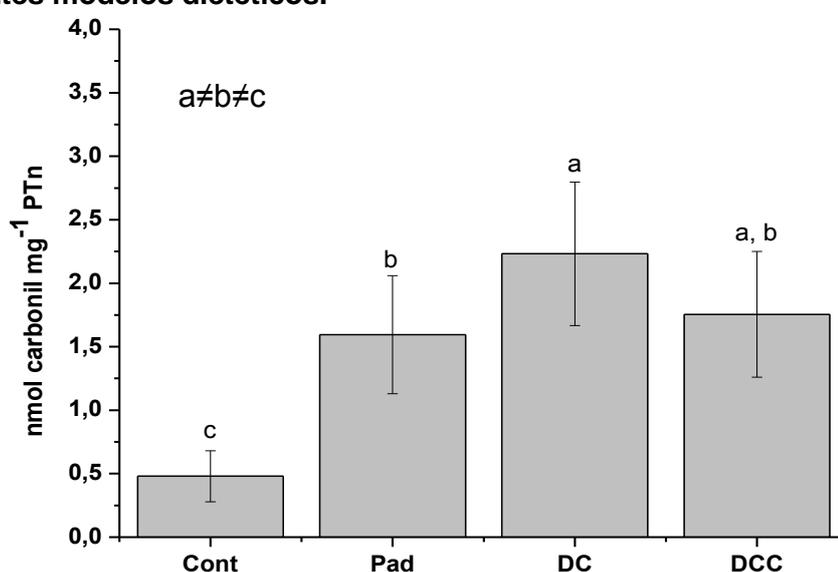
(KUMAR et al., 2012), comparou pacientes portadores de DFGNA, Hepatite viral crônica (HVC) e pacientes sem nenhum desses acometimentos, ele verificou que tanto os portadores da DFGNA quanto HVC possuíam níveis aumentados de MDA em comparação ao grupo sem a doença, além disso, pacientes DFGNA possuem níveis maiores de MDA em comparação aos HVC. Anormalidades mitocondriais também podem ser responsáveis por um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e representam a progressão da doença na maioria das formas de DFGNA. A atividade excessiva desta organela no dano hepatocelular ocasiona disfunção com prejuízo à oxidação de nutrientes, produção de ATP bem como outras reações.

Um importante ponto observado em relação à peroxidação lipídica e ao primeiro sistema de defesa antioxidante, o sistema glutathiona, foi que apesar de todos os grupos AIN-93 apresentarem esteatose, observou-se elevação significativa das concentrações de MDA, apenas nos grupos deficientes, indicando maior intensidade de peroxidação lipídica, ao contrário do sistema glutathiona que apresentou atividade suprimida em todos os animais alimentados

com estas dietas. Assim pode-se sugerir atividade protetora do sistema glutaciona nos animais que apresentavam graus discretos/leves de dano hepatocelular (confirmado pela análise histológica).

5.7 Dosagem de grupamentos carbonílicos

Figura 23– Concentração de proteínas carboniladas em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração em nmol de carbonil por mg de proteína (PTn).

Tabela 9 – Descrição estatística das proteínas carboniladas do extrato hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Cont	8	,4804	,20093	,07104	,3124	,6484	,14	,69
Pad	7	1,5953	,46506	,17578	1,1652	2,0254	1,01	2,35
DC	9	2,2317	,56498	,18833	1,7974	2,6660	1,02	3,00
DCC	7	1,7549	,49568	,18735	1,2964	2,2133	1,09	2,44
Total	31	1,5966	,72425	,10044	1,3950	1,7982	,14	3,04

Fonte: autor, 2014.

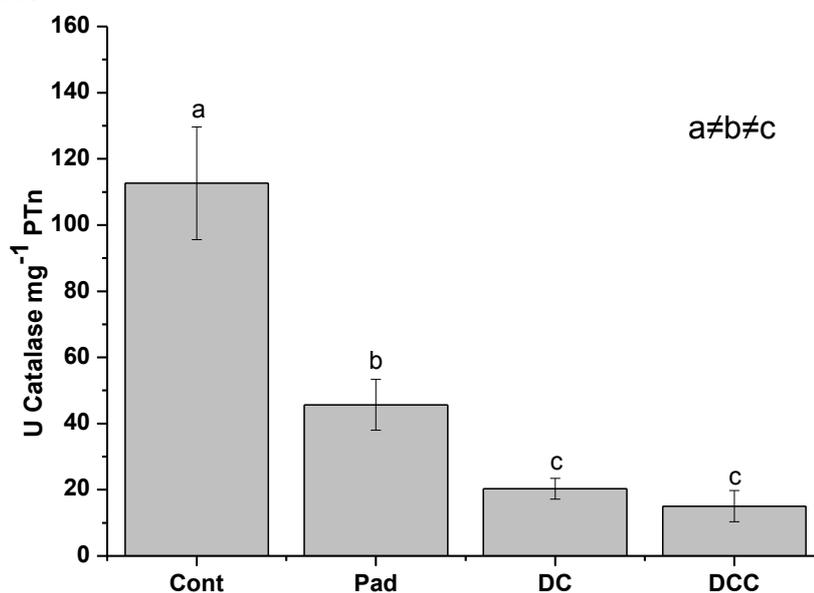
Em relação às proteínas carboniladas, o grupo DC apresentou resultados significativamente superiores ao grupo Pad ($p < 0,05$). O grupo DCC apresentou concentração igual aos grupos Pad e DC ($p > 0,05$) e superior ao grupo Cont ($p < 0,05$).

A metionina, reconhecido fator lipotrófico, contribui para a formação de S-adenosilmetionina (SAME) o que pode resultar em deficiência de GSH (glutathiona reduzida) em modelos DC e DCM. A SAME é necessária para a atividade ótima de metionina adenosil-transferase (MAT) no fígado, portanto uma deficiência hepática de MAT pode em parte ser devida a uma deficiência de GSH. Além disso, MAT é sensível ao estresse oxidativo, em que uma oxidação no sítio ativo da enzima leva à diminuição de sua atividade. (MAYO et al., 2002; CAVE et al., 2007; MARCOLIN et al., 2011). Corroborando com resultados anteriormente descritos, trabalhos de (MAYO et al., 2011; LIU., 2008) mostraram que animais alimentados com dietas DCM possuíam níveis mais baixos de GSH e elevados níveis de GSSG, suprimindo assim a atividade da GPx e outras enzimas.

Além do dano oxidativo na membrana lipídica dos hepatócitos, o presente trabalho observou, também, níveis aumentados de proteínas carboniladas nos grupos com esteatose, tanto nos animais alimentados com AIN-93, como nos grupos deficientes figura 23. Resultados semelhantes foram encontrados por (PARK et al., 2013), cujo estudo identificou níveis elevados tanto de peroxidação lipídica como de proteínas carboniladas nos animais que receberam dieta deficiente em metionina e colina. Diversos estudos experimentais demonstram que o estresse oxidativo crônico, mesmo em níveis mínimos, pode causar um desequilíbrio redox de maneira pró-oxidante afetando a função das proteínas susceptíveis ao dano oxidativo.

5.8 Avaliação enzimática da catalase (CAT)

Figura 24 – Concentração de catalase em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração em U de catalase por mg de proteína (PTn)

Tabela 10 – Descrição estatística da catalase do extrato hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interv for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Upper	Bound Bound		
Cont	10	112,6250	17,00068	5,37609	100,4634	124,7866	96,23	153,60
Pad	10	45,6660	7,70946	2,43794	40,1510	51,1810	37,11	59,99
DC	10	20,3240	3,16164	,99980	18,0623	22,5857	16,25	26,09
DCC	10	15,0370	4,73675	1,49789	11,6485	18,4255	9,03	21,71
Total	40	40,2787	33,97833	4,09051	32,1162	48,4412	7,00	153,60

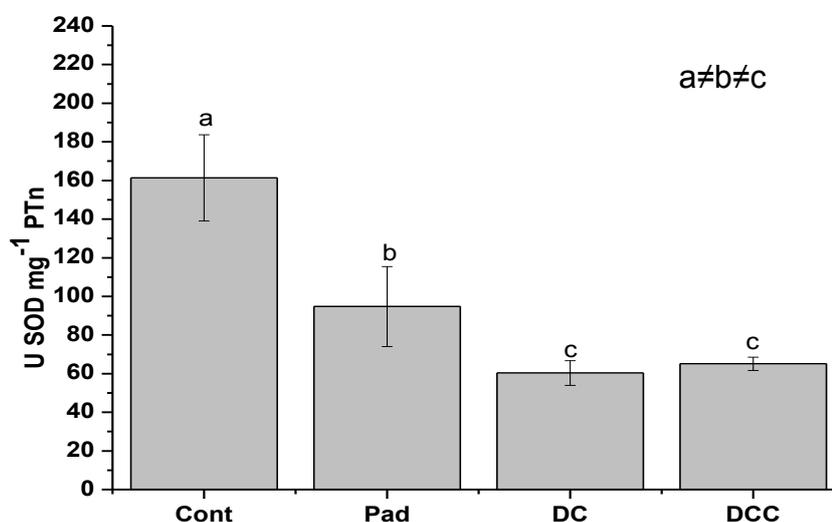
Fonte: autor, 2014.

Os níveis de catalase não diferiram entre si nos grupos deficientes DC e DCC ($p < 0,05$), sendo esses resultados inferiores aos encontrados no grupo Pad

($p < 0,05$) e Cont ($p < 0,05$). Os animais do grupo Cont apresentaram níveis de catalase maiores que os dos grupos ($p < 0,05$).

5.9 Avaliação da enzima superóxido dismutase (SOD)

Figura 25– Concentração de SOD em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. *Cont- Controle (dieta comercial).



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração em U SOD mg de proteína (PTn).

Tabela 11– Descrição estatística da superóxido dismutase do extrato hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Cont	6	161,3656	22,34566	9,12258	137,915	184,8160	129,86	188,09
Pad	7	94,7289	20,65893	7,80834	75,6226	113,8352	72,27	119,53
DC	7	60,3374	6,37191	2,40835	54,4443	66,2304	51,54	67,09
DCC	7	65,1197	3,44211	1,30100	61,9363	68,3031	59,42	69,35
Total	27	86,8915	34,32764	4,80683	77,2367	96,5463	51,54	188,09

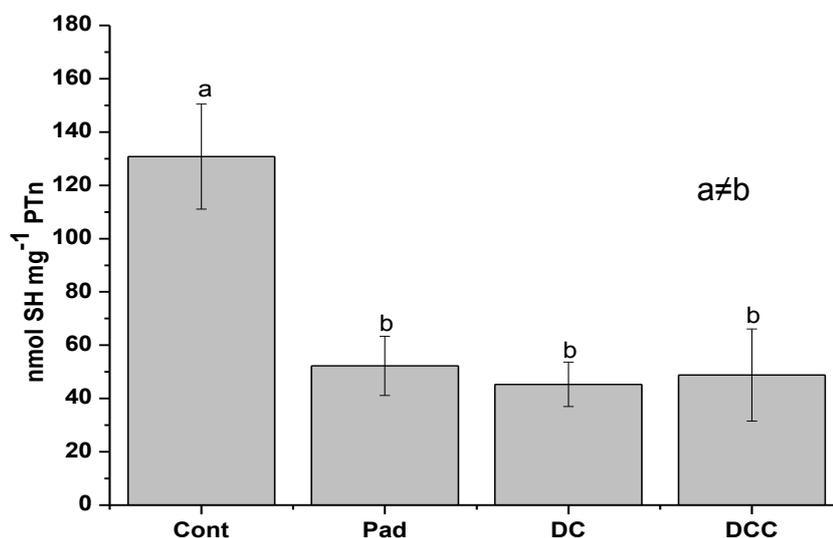
Fonte: autor, 2014.

Os grupos alimentados com as dietas deficientes (DC e DCC) apresentaram os menores níveis de concentração, não diferindo entre si ($p < 0,05$). O grupo Pad apresentou maiores níveis de SOD, em relação aos grupos deficientes ($p < 0,05$) e o grupo Cont obteve maiores resultados em relação a todos os grupos ($p < 0,05$).

No estudo da atividade antioxidante foram realizados os ensaios enzimáticos para Catalase e SOD (Figuras 24 e 25). De acordo com estas análises, observou-se o mesmo comportamento entre os animais deficientes DC e DCC: ambos apresentaram níveis inferiores ao grupo Pad, e este, mais baixo que o grupo Cont. Resultados semelhantes foram encontrados por (PARK et al., 2013), que utilizando dieta DCM, evidenciaram uma redução significativa nos níveis de SOD e catalase. (KUMAR et al., 2013), observaram que pacientes com dano hepatocelular e hepatite viral crônica, também possuíam atividade reduzida da catalase no tecido hepático, em comparação a pacientes saudáveis. A diminuição da atividade desta enzima pode ser decorrente de alterações estruturais e funcionais induzidas pelas EROs, bem como pelo seu esgotamento na tentativa de destoxificar o organismo destas e de outras espécies radicalares.

5.10 Dosagem de tiois totais (SH)

Figura 26 – Concentração de tiois totais em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.



Fonte: autor, 2014.

Notas: Cont, Controle; Pad Padrão; DC, Deficiente em colina; DCC, Deficiente em colina e metionina peletizada; Concentração em nmol de SH mg de proteína (PTn).

Tabela 12 – Descrição estatística de tiois totais do extrato hepático nos diferentes grupos.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interv for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Upper	Bound Bound		
Cont	10	130,798	19,72852	6,2387	116,685	144,910	101,13	162,91
Pad	10	52,2350	11,10808	3,5126	44,2888	60,1812	37,98	70,13
DC	10	45,3120	8,34097	2,6376	39,3452	51,2788	30,59	63,65
DCC	10	48,8260	17,27048	5,4614	36,4714	61,1806	18,67	77,06
Total	40	63,1542	32,58190	3,9224	55,3272	70,9812	18,67	162,91

Fonte: autor, 2014.

Em relação à análise de tiois totais, foram obtidos resultados iguais entre os grupos deficientes (DC e DCC) e Pad e altas concentrações de tiois no grupo Cont. nos trabalhos: (CHEUNG; LEE; RAMAN, 2012; LARTER et al., 2008;

SANTOS et al., 2013; VETELÄINEN; VAN VLIET; VAN GULIK, 2007), onde avaliaram o estresse oxidativo de animais alimentados com dietas DCM e observaram dano aumentado pela diminuição dos níveis de tiois totais nos animais deficientes. Resultados similares foram encontrados em nossos trabalhos com níveis mais baixos de tiois nos grupos de animais deficientes (DC e DCC) e Pad figura 26.

5.11 Correlação DPPH extrato e biomarcadores do desequilíbrio redox (TBARS, CARBONIL, CATALASE e SOD)

Tabela 13 – Correlação DPPH do extrato hepático com os biomarcadores do desequilíbrio redox, segundo o grupo de tratamento.

GRUPO	DPPH EXTRATO									
	TBARS		CARBONIL		CATALASE		TIOS TOTAIS		SOD	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Cont	-	-	0,80*	0,03*	-	-	-	-	-	-
Pad	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCC	0,90*	0,03*	-	-	-0,80*	0,03*	-	-	-	-

Fonte: autor, 2014.

De acordo com a tabela 13, podemos perceber que o DPPH analisado no extrato hepático apresentou correlação forte e significativa com a carbonilação de proteínas no grupo controle. No entanto, esse padrão não se repetiu nos demais grupos, ocorrendo correlação significativa apenas no grupo DCC, sendo esta positiva com o TBARS e negativa com os níveis de catalase. Não houve correlação entre o DPPH sorológico com os marcadores do desequilíbrio redox (dados não mostrados).

Ao analisarmos o resultado da correlação de Pearson entre o DPPH do extrato hepático e os marcadores clássicos do desequilíbrio redox, segundo o grupo de tratamento (tabela 13), percebemos que este se correlacionou positivamente com a carbonilação de proteínas no grupo controle. Já no grupo com dano hepatocelular intenso (DCC), essa correlação deixou de existir,

passando o DPPH a se correlacionar positivamente com a peroxidação lipídica (TBARS) e inversamente com a catalase. Não foi observada qualquer correlação entre DPPH e os demais parâmetros de desequilíbrio redox nos grupos Pad e DC. O DPPH presente no sangue não se mostrou sensível ou específico na avaliação do desequilíbrio redox (dados não mostrados).

Avaliando o DPPH do extrato hepático, percebemos que quando a peroxidação lipídica está em um grau avançado, ou seja, quando o dano celular com maior intensidade, bem como a defesa antioxidante está reduzida, vista pelos baixos níveis de catalase, este biomarcador (DPPH) torna-se específico na identificação deste desequilíbrio, uma vez que nos danos hepatocelulares de menor intensidade (Grupos Pad e DC), não foi identificada qualquer correlação entre os demais indicadores de dano oxidativo ou defesa antioxidante.

Apesar da análise de DPPH ser comum em extratos vegetais, a adaptação do método a materiais biológicos, se mostrou relevante na identificação de defesas antioxidantes *in vivo*, uma vez que suas correlações com métodos tradicionais de defesa (SOD, Tiois e Catalase) e de dano pró-oxidativo (TBARS e Carbonil), apresentaram relevância significativa.

Como se trata de um método clássico de análise em extratos vegetais, a adaptação do método em material biológico deve ser testada em outros estudos, para comprovação de sua eficácia.

7 CONCLUSÃO

- Todos os animais alimentados com a dieta AIN-93 (com e sem modificações) apresentaram DFGNA, como evidenciado pela análise histológica e dano oxidativo, quando comparados ao grupo controle.
- Apesar de o modelo dietético proposto ter como objetivo criar níveis diferentes de DFGNA, não se verificou diferença entre o perfil redox destes grupos (DC e DCC), mesmo com alterações histológicas características de fases distintas da doença, indicando a possibilidade de que EO pode alcançar seu máximo em estágios anteriores à esteato-hepatite não alcoólica.
- O uso do método do DPPH comumente utilizado em extrato vegetal mostrou-se promissor em extrato hepático e soro, por apresentar resultados semelhantes àqueles a partir de biomarcadores amplamente utilizados.
- O uso do DPPH nas análises em soro mostrou-se eficiente para avaliar o dano em graus distintos no estudo em questão, possuindo este a vantagem de ser de simples preparo e alta reprodutibilidade.
- Estudos devem ser continuados com o uso do DPPH para garantir este como um marcador de dano hepático, em um estágio que preceda a esteato-hepatite.

REFERÊNCIAS

-
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v.105, p.121-126,1984.
- AL GHOULEH, I. et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 7, p. 1271–88, 1 out. 2011.
- ANSTEE, Q. M.; DAY, C. P. The genetics of NAFLD. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 11, p. 645–55, nov. 2013.
- BARRA, K. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios. **revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010a.
- BARRA, K. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010b.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Divulgação. v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BITENCOURT, A. G. V et al. Doença hepática gordurosa não alcoólica : características clínicas e histológicas em obesos graves submetidos à cirurgia bariátrica. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, v. 37, 2007.
- BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **the journal of clinical investigation**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2004.
- CAVE, M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 184–195, mar. 2007a.
- CAVE, M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 184–95, mar. 2007b.
- CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury : Insights from animal models. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 38–44, 2013.
- CHEUNG, K.; LEE, S. S.; RAMAN, M. Prevalence and mechanisms of malnutrition in patients with advanced liver disease, and nutrition management strategies. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 10, n. 2, p. 117–25, fev. 2012.
- CHITTURI, S. et al. NASH and Insulin Resistance: Insulin Hypersecretion and Specific Association With the Insulin Resistance Syndrome. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 35, n. 2, p. 373–379, 2002.
- CODOÑER-FRANCH, P. et al. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Translational research : the**

journal of laboratory and clinical medicine, v. 158, n. 6, p. 369–84, dez. 2011.

CORBIN, K. D.; ZEISEL, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. **Current opinion in gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 159–65, mar. 2012.

DE MELO LUCENA, A. L. et al. High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 2, p. 166–172, fev. 2010.

DE SOUSA, A. et al. Metalaxyl-induced changes in the antioxidant metabolism of *Solanum nigrum* L. suspension cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 2, p. 235–243, out. 2013.

DEN BOER, M. et al. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 4, p. 644–9, abr. 2004.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO / ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH • 1. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 8, n. 1, p. 35–44, jan. 2011.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–56, 23 mar. 2005.

IP, E. et al. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 39, p. 1286–1296, 2004.

JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 1, p. 227–8, jul. 2011.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11963–11980, jan. 2013.

KOH, E. H. et al. Effects of alpha-lipoic Acid on body weight in obese subjects. **The American journal of medicine**, v. 124, n. 1, p. 85–88, jan. 2011.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free radical biology & medicine**, v. 33, p. 154–172, 2002.

KUMAR, A. et al. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, n. November, p. 1–7, 2012.

- KUMAR, A. et al. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 12–18, 2013.
- LARTER, C. Z. et al. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. **Journal of hepatology**, v. 49, n. 3, p. 407–16, set. 2008.
- LEE, J. Y. et al. Dietary Oleate Has Beneficial Effects on Every Step of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression in a Methionine- and Choline-Deficient Diet-Fed Animal Model. p. 489–496, 2011.
- LORENZI, R. et al. Oxidative damage in the liver of rats treated with glycolaldehyde. **International journal of toxicology**, v. 30, n. 2, p. 253–8, mar. 2011.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LUO, Z. C. et al. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: programming by oxidative stress? **Medical hypotheses**, v. 66, p. 38–44, 2006.
- MAHER, J. J. New insights from rodent models of fatty liver disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 2, p. 535–50, 15 jul. 2011.
- MARCOLIN, É. et al. GASTROENTEROLOGIA EXPERIMENTAL / EXPERIMENTAL GASTROENTEROLOGY CHARACTERISTIC OF. n. 1, p. 72–79, 2011.
- MATO, J. M. et al. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, p. 15–26, 2002.
- MÉNDEZ, L. et al. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω 3 PUFAs. **Free radical biology & medicine**, v. 55, p. 8–20, fev. 2013.
- MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 459–481, 2007.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, out. 2004.
- NEUSCHWANDER-TETRI, B. A; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 37, n. 5, p. 1202–19, maio 2003.
- PARK, H.-J. et al. Chunggan extract (CGX), methionine-and choline-deficient (MCD) diet-induced hepatosteatosis and oxidative stress in C57BL/6 mice. **Human & experimental toxicology**, v. 32, n. 12, p. 1258–69, dez. 2013.
- REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302–19, 1 out. 2011.
- REEVES, P. G.; SUPPL, M. Symposium : Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet 1 , 2. p. 838–841, 1997.

- ROGERS, A. E. Variable effects of a lipotrope-deficient, high-fat diet on chemical carcinogenesis in rats. **Cancer Res**, v. 35, p. 2469–2474, 1975.
- RUSKOVSKA, T.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **Journal of proteomics**, v. 92, p. 323–34, 30 out. 2013.
- SANTOS, J. C. D. F. et al. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 19846–66, jan. 2013.
- SARMENTO, F. et al. Atividade antioxidante do açaí Antioxidant activity of açaí. v. 10, n. 5, p. 310–316, 2011.
- SCHNEIDER, J. L.; CUERVO, A. M. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, 5 nov. 2013.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.
- VASCONCELOS, S. et al. reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- VETELÄINEN, R.; VAN VLIET, A.; VAN GULIK, T. M. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, n. 9, p. 1526–33, set. 2007a.
- VETELÄINEN, R.; VAN VLIET, A.; VAN GULIK, T. M. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 22, n. 9, p. 1526–33, set. 2007b.
- VIAL, G. et al. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. **Journal of hepatology**, v. 54, p. 348–356, 2011.
- WELTMAN, M. D.; FARRELL, G. C.; LIDDLE, C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1645–1653, 1996.
- WU, J. et al. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 10, p. 1367–75, out. 2010.
- YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 45, p. 1366–1374, 2007.
- ZAIA, C. T. B. V. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS VIA ESPECTROFOMETRIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS EXISTENTES. **Química nova**, v. 6, p. 787–793, 1998.

ZAMIN, I. et al. GASTROENTEROLOGIA EXPERIMENTAL / EXPERIMENTAL GASTROENTEROLOGY. **Gastroenterologia experimental**, v. 46, n. 1, p. 69–74, 2009.