

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

LEONARDO RECENA AYDOS

**SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DA POLPA DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) PARA
PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA
HIPERLIPÍDICA EM CAMUNDONGOS**

Campo Grande – MS

2021

LEONARDO RECENA AYDOS

**SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DA POLPA DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) PARA
PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS POR DIETA
HIPERLIPÍDICA EM CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Coorientadora: Dra. Elisvânia Freitas dos Santos

Linha de pesquisa: Metabolismo e Nutrição

**Campo Grande – MS
2021**

FOLHA DE APROVAÇÃO



Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Tese Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste Doutorado

Aos dezoito dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, às catorze horas, na à distância videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Maria Ligia Rodrigues Macedo (UFMS), Ana Cristina Jacobowski (UFMS), Janaina de Cassia Orlandi Sardi (UFMS), Kátia Wolff Cordeiro (UNIDERP) e Priscila Aiko Hiane (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **LEONARDO RECENA AYDOS**, CPF 04442076197, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "Suplementação de óleo da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*) para prevenção das alterações metabólicas induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos" e orientação de Maria Ligia Rodrigues Macedo. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiação
Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo (Interno)		Aprovado
Dra. Ana Cristina Jacobowski (Externo)		Aprovado
Dra. Janaina de Cassia Orlandi Sardi (Externo)		Aprovado
Dra. Kátia Wolff Cordeiro (Externo)		Aprovado
Dra. Priscila Aiko Hiane (Interno)		Aprovado
Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimarães (Interno) (Suplente)		

RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a minha
família, alicerce fundamental que
sempre me apoiou em todos os
momentos.*

AGRADECIMENTOS

A realização deste doutorado só foi possível pela ajuda de diversas pessoas. Agradeço enormemente a todos que tornaram esta tarefa possível.

Agradeço a minha mãe, Professora Maria Celina Piazza Recena e a meu pai, Professor Ricardo Dutra Aydos, que sempre foram grandes motivadores e incentivadores para que eu entrasse no programa e sempre foram um porto seguro em todos os momentos da vida.

A Professora Kátia Wolff Cordeiro, que plantou a semente na minha mente, com a ideia da realização do doutorado, não fosse seu incentivo talvez este doutorado não acontecesse, pelo menos não tão cedo.

As Professoras Rita de Cássia e Karine, que foram fundamentais ao me auxiliarem na elaboração do projeto submetido à seleção do programa.

A Ana Cristina Jacobowski, que sempre me apoiou e confiou em mim, que me ensinou muito e que foi uma grande parceira em diversos experimentos.

A Claudiane, pelas inúmeras horas divididas comigo replicando bactérias, sem se importar em fazer isto mesmo em uma sexta feira 22h.

A Susi Wider, por todos os ensinamentos – e broncas – que me passou sobre o funcionamento do laboratório, pela parceria na escrita de artigos e realização de diferentes técnicas.

A todos membros do LPPFB que sempre foram extremamente respeitosos, prestativos e parceiros em tudo que foi preciso, muito obrigado Luís, Caio, Carolina, Camila, Suellen, Lauriane. Especialmente as técnicas: Simone, Camila, Patrícia e Laynara e a Professora Janaína.

A Roberta Serafim, por toda ajuda durante o experimento, escrita de artigos e pela amizade e conversas que tornaram esta jornada muito mais agradável.

Aos técnicos do laboratório do DTA, Aline, Osmar e Márcio.

A Professora Landara, por toda ajuda no manuseio dos animais e a todos do Laboratório de Modelos Experimentais de Doença.

Ao Professor Eduardo Benedetti Parisotto, por toda sua colaboração e paciência na realização de diversas análises.

A todos colaboradores, que tornaram esta pesquisa viável: Professor Felipe Francisco Bittencourt Junior, Emely Schuindt Fernandes, Professora Luciane

Candeloro Portugal, Luciane Candeloro Portugal, Gustavo Tsuyoshi Senra Masuko, Professor Carlos Eduardo Domingues Nazário e Leandro Fontoura Cavalheiro.

Palavras não são suficientes para agradecer a minha coorientadora Professora Elisvânia Freitas dos Santos, que sempre esteve ao meu lado. Sou grato por cada eutanásia que pude participar, pelo comprometimento em me auxiliar durante a gavagem, mesmo em um sábado de manhã, pelas inúmeras horas dedicadas corrigindo artigos e por todos os conselhos e apoio que me deu durante estes 4 anos de doutorado.

Agradeço a Luane Amaral, que foi fundamental em diversas etapas desta pesquisa, sempre eficiente e prestativa.

Agradeço a Mariana Menezes, cuja ajuda foi fundamental durante a realização do experimento.

Agradeço a Liziane Machado, por todo apoio incondicional, e pelas diversas horas que abdicou em me ajudar de diferentes formas para que esta pesquisa fosse possível.

Agradeço a toda equipe do laboratório da professora Elisvânia que sempre me ajudou quando foi preciso: Gabriel, Gabriela, Willian, Taiz e Laís.

Por fim, deixo por último meu enorme agradecimento à Professora Maria Lígia Rodrigues Macedo, por ter acreditado e aceitado a aposta de ter um orientado que não era de sua área. Que, ao longo de diversas reuniões de laboratório e encontros, não só ensinou como realizar uma pesquisa, mas também, foi um exemplo de liderança ética e justa. Que me proporcionou ensinamentos que jamais imaginei que iria adquirir durante o doutorado e que serão levados para toda vida.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A síndrome metabólica está presente em grande parcela da população mundial e o número de acometidos em crescimento. Devido ao impacto na saúde e economia, causado em razão desta condição, atualmente, é considerada um problema de saúde pública a ser enfrentado. Embora o estabelecimento da doença seja multifatorial, a alimentação é um dos fatores primordiais. Por isso, pesquisadores em todo mundo têm se empenhado na busca de alimentos com propriedades funcionais que possam auxiliar no tratamento da síndrome metabólica e dos fatores de risco associados. Nesse sentido, o óleo bruto da polpa de buriti (BPO), alimento tradicionalmente consumido por residentes no Pantanal, Cerrado e Amazônia brasileira, devido a ser rico em ácido oleico, tocoferóis e carotenoides, emerge como um alimento com potencial funcional. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de BPO nos distúrbios metabólicos causados por uma dieta hiperlipídica. Foi realizado um estudo experimental com quatro grupos de camundongos C57bl/6. Um grupo magro com dieta AIN-93M e suplementação com óleo controle, um grupo obeso com dieta hiperlipídica e suplementação com óleo controle e dois grupos obesos com uma dieta hiperlipídica e suplementação de BPO nas quantidades de 50 e 100 mg / kg. Ao final do experimento, verificamos que o BPO agravou o estado metabólico causado pela dieta hiperlipídica, agravando os fatores de risco associados à síndrome metabólica, como circunferência abdominal e gordura retroperitoneal, níveis séricos de colesterol total, ácido úrico, alanina transaminase, glicose e triglicérides, além de gordura renal, além de às mudanças no controle glicêmico e marcadores de estresse oxidativo. Concluindo, camundongos C57bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com BPO de forma preventiva, ou seja, antes da instauração das alterações metabólicas características da obesidade e síndrome metabólica, apresentaram piora nos fatores de risco metabólicos associados a estas condições.

Palavras-chave: óleo de buriti, síndrome metabólica, obesidade

ABSTRACT

Metabolic syndrome is present in a large portion of the world population, and the number of people affected is growing. Due to the impact on health and the economy caused by this condition, metabolic syndrome is currently considered a public health problem to be faced. Although the onset of the disease is multifactorial, food is one of the primary factors. For this reason, researchers around the world have been engaged in the search for foods with functional properties that can help in the treatment of metabolic syndrome and the risk factors associated with it. In this sense, buriti pulp oil (BPO), a food traditionally consumed by residents in the Pantanal, Cerrado, and Brazilian Amazon, due to being rich in oleic acid, tocopherols, and carotenoids, emerges as a portion of food with functional potential. Thus, this study aimed to evaluate the effect of BPO supplementation on metabolic disorders caused by a high-fat diet. To verify this, an experimental study was carried out with four groups of C57bl/6 mice. One lean group with AIN-93M diet and control oil supplementation, one obese group with high-fat diet and control oil supplementation, and two obese groups with a high-fat diet and BPO supplementation in the amounts of 50 and 100 mg/kg. At the end of the experiment, we found that BPO worsened the metabolic state caused by the high-fat diet, worsening the risk factors associated with MS, such as abdominal circumference and retroperitoneal fat, serum levels of total cholesterol, uric acid, alanine transaminase, glucose, and triglycerides, in addition to renal fat, in addition to changes in glycemic control and oxidative stress markers. C57bl/6 mice fed a high-fat diet and supplemented with BPO preventively, that is, before the onset of the metabolic changes characteristic of obesity and metabolic syndrome, showed a worsening in the metabolic risk factors associated with these conditions.

Keywords: buriti oil, metabolic syndrome, obesity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta do tecido adiposo ao balanço energético positivo	24
Figura 2. Tecido adiposo disfuncional	25
Figura 3. Mecanismo básico que acarreta o aumento da resistência à insulina após elevação nos níveis séricos de ácido úrico	28
Figura 4. Ácido úrico e estresse oxidativo	30
Figura 5. Lipotoxicidade na síndrome metabólica e doença hepática gordurosa não alcoólica	31
Figura 6. Fruto de Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-coa carboxilase
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ChREBP	Proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos
DAMPS	Proteínas moleculares associadas a dano
DGAT1	Diacilglicerol O-aciltransferase 1
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
GGT)	Gamaglutamiltransferase
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GPAT4	Glicerol-3-fosfato aciltransferase 4
HNF4	Fator Nuclear de Hepatócitos 4
IMC	Índice de Massa Corporal
IRS-1	Substrato-1 do receptor de insulina
JNK	N-terminal c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeos
LXR	Receptor X do fígado
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
NF- κ β	Fator nuclear kappa β
NLRP3	Domínio da pirina da família NLR contendo 3
PLIN2	Perilipina
PPAR- α	Receptor ativado pelo proliferador de Peroxissoma alfa
PPAR- γ	Proliferador de peroxissoma alfa gama
PXR	Receptor pregnano X
RAR	Receptor de ácido retinóico
RXR	Receptor de retinoide X
SCD1	<i>Stearoyl-coa desaturase</i>
SREBP-1	Fator 1 de transcrição de ligação a elemento Regulador de esterol
SREBP-2	Fator 2 de transcrição de ligação a elemento Regulador de esterol
sTREM-1	Receptor expresso por células mieloides 1
TLR2	Receptores do tipo toll 2
TLR4	Receptores do tipo toll 4
UCP1	Proteína desacopladora 1

SUMÁRIO

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 SÍNDROME METABÓLICA	17
2.1.1 Epidemiologia da síndrome metabólica.....	18
2.1.2 Fisiopatologia da síndrome metabólica	19
2.1.2.1 Características e funções do tecido adiposo	21
2.1.2.2 Disfunção do tecido adiposo	23
2.2 MARCADORES ASSOCIADOS À SÍNDROME METABÓLICA.....	26
2.2.1 Resistência à insulina.....	26
2.2.1 Circunferência da cintura.....	26
2.2.2 Alanina Aminotransferase e aspartato aminotransferase	27
2.2.3 Ácido úrico	27
2.2.4 Colesterol e triglicerídeos.....	30
2.3 ESTUDOS ANIMAIS COM ÓLEOS PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA	32
2.4 BURITI (<i>Mauritia flexuosa</i>).....	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 RESULTADOS	37
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE 1. ARTIGO DE REVISÃO	51
APÊNDICE 2. ARTIGO DE REVISÃO	68
APÊNDICE 3. ARTIGO DE RESULTADOS	81

APÊNDICE 4 – DIETA UTILIZADA NO EXPERIMENTO	95
ANEXO 1. CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO	96
ANEXO 2. CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO	97
ANEXO 3. CADASTRO SISGEN.....	98

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas um ambiente obesogênico tem se instaurado em diversos países do mundo. O estilo de vida caracterizado pela alta ingestão de alimentos densamente calóricos – mas pobres em nutrientes –, o aumento no consumo de gorduras trans e aditivos alimentares e a baixa atividade física têm gerado consequências à saúde da população mundial (SAHAGÚN et al., 2012).

No Brasil, em 2009, a desnutrição era o principal fator de risco de morte. Após uma década, em 2019, esta condição ocupa a 7ª colocação, enquanto o Índice de Massa Corporal (IMC) elevado se encontra em primeiro lugar (IHME, 2021).

A combinação de baixa atividade física e superalimentação, pode levar à obesidade, doença que aumenta o risco do desenvolvimento de diabetes melito tipo II, doenças cardiovasculares, apneia do sono, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), síndrome metabólica e outras comorbidades e doenças crônicas não transmissíveis (SAHAGÚN et al., 2012).

Nesse sentido, ano após ano, a busca de medicamentos, dietas, alimentos, exercícios físicos e terapias complementares para o tratamento da obesidade têm crescido, atingindo um total de 31.847 pesquisas indexadas no PudMed em 2020.

O principal tratamento para reversão da obesidade consiste na redução de calorias consumidas, aumento de atividade física e terapia cognitivo comportamental (MAKRIS; FOSTER, 2011). Ingerir menos calorias do que se consome, ou seja, ter um balanço energético negativo é um fator fundamental para a perda de peso. Entretanto, a forma com que isto é feito têm sido objeto de estudo de diversas pesquisas. Hoje sabemos que, não só o total calórico importa, mas também a distribuição de macronutrientes e micronutrientes, o horário de realização e quantidade das refeições, os alimentos que compõem a dieta e outros fatores também influenciam no processo de controle da obesidade (ARD et al., 2016).

Atualmente, é inequívoco que alimentos não possuem somente funções energéticas, mas também influenciam funções celulares primordiais, como a expressão gênica e a maturação de proteínas. A capacidade dos nutrientes regularem a expressão de proteínas, e conseqüentemente, influenciarem o funcionamento de glândulas, órgãos e tecidos, elenca a utilização de alimentos com potencial funcional para o tratamento de doenças (LORENZERI, 2015).

Dessa forma, surge a nutrigenômica, ciência destinada a estudar como os alimentos alteram a ação transcricional (transcriptômica), traducional (proteômica) e metabólica (metabolômica) (LORENZERI, 2015). Ao determinar como a nutrição influencia vias metabólicas e o controle homeostático, a nutrigenômica abre caminho para utilização de intervenções dietéticas eficazes, capazes de prevenir doenças e contribuir para melhora da saúde (MÜLLER et al., 2003).

Os nutrientes podem regular a atividade celular por intermédio de mecanismo transcricionais, ou seja, alterando a transcrição de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), ou pós-transcricionais, influenciando na tradução de proteínas. A regulação da transcrição mediada por nutrientes pode acontecer de forma direta, quando um nutriente se liga a um fator de transcrição e altera a expressão de genes, ou de forma indireta, que ocorre quando determinado nutriente se liga a uma proteína que por sua vez regula o funcionamento de fatores de transcrição. Nutrientes podem tanto ativar/aumentar a transcrição de genes (*upregulation*) quanto inibir/reduzir (*downregulation*) (LORENZERI, 2015).

Os ácidos graxos podem se ligar a receptores específicos que alteram o funcionamento de fatores de transcrição nuclear, dessa forma a expressão de diversos genes pode ser alterada de acordo com a composição dos lipídeos da dieta. Segundo Müller et al. (2003), os principais fatores de transcrição modulados por ácidos graxos são: PPARs (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma), SREBPs (Proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol), LXR (Receptor X do fígado), HNF4 (Fator Nuclear de Hepatócitos 4) e ChREBP (Proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos).

Por isto, a capacidade dos óleos e gorduras influenciarem o metabolismo tem sido alvo de diversas pesquisas experimentais em camundongos (C57bl/6) (AYDOS et al., 2019).

Vale destacar que, além dos lipídeos, as vitaminas também regulam diversos fatores de transcrição como, por exemplo, o RXR (receptor de retinoide X) e o RAR (receptor de ácido retinóico) cuja atividade pode ser influenciada pela vitamina A, e o PXR (receptor pregnano X) que pode ter sua função regulada pela vitamina E. Além disto, as vitaminas A e E, apresentam potencial antioxidante (MÜLLER et al., 2003).

Neste sentido, é bem descrito que o dano oxidativo está positivamente correlacionado com a obesidade e desempenha papel importante no estabelecimento e progressão da DHGNA, aumentando a inflamação, a resistência à insulina e

contribuindo para a progressão da fibrose hepática (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ ET AL., 2011; BESSE-PATIN et al., 2014; FERRAMOSCA *et al.*, 2017; MASARONE *et al.*, 2018; TSUCHIDA *et al.*, 2017).

Há a hipótese de que restabelecer o estado redox no fígado e tecido adiposo pode ser uma estratégia para aliviar a obesidade (FURUKAWA *et al.*, 2004). Assim, alimentos com nutrientes antioxidantes e compostos bioativos podem ser adjuvantes no tratamento da síndrome metabólica e dos distúrbios a ela associados. Nesse contexto, o óleo bruto da polpa de buriti (BPO) surge como um alimento funcional potencial.

No entanto, poucos experimentos com animais investigaram os possíveis benefícios e riscos da ingestão de BPO. E, até o momento, não foram realizados estudos sobre o uso de BPO na prevenção e tratamento da síndrome metabólica e das alterações metabólicas relacionadas à obesidade.

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi verificar os efeitos da suplementação de BPO nas alterações correlacionadas à síndrome metabólica provocadas por uma dieta hiperlipídica, como a desregulação na homeostase da glicose e perfil lipídico, o acúmulo de gordura na região visceral, a alteração de marcadores relacionados ao risco cardiometabólico e a DHGNA.

Para responder a esse questionamento, inicialmente foi desenvolvida uma revisão bibliográfica sobre a obesidade, síndrome metabólica e óleo da polpa de buriti, apresentada no capítulo 2 - Referencial Teórico, e uma revisão sobre DHGNA estruturada em artigo apresentado no apêndice 1. No capítulo 3 são apresentados os objetivos desta pesquisa. Os resultados encontram-se nas publicações conforme indicado no capítulo 4. A metodologia empregada em cada etapa de pesquisa está especificada nas publicações que constam nos apêndices. Por fim, o capítulo 5 apresenta as conclusões à guisa de respostas ao problema de pesquisa e objetivos propostos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica não é, de fato, uma doença, mas uma condição, que se estabelece de acordo com a presença de diferentes fatores de risco cardiometabólico (SAKLAYEN et al., 2018).

Fatores de risco cardiometabólico é o nome dado aos fatores que englobam componentes que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Dentre os fatores estão: hipertriglicidemia, hiperglicemia, perfil lipídico alterado (baixo colesterol HDL e níveis elevados de triglicérides), obesidade abdominal, dislipidemia e resistência à insulina (VÁZQUEZ et al., 2019).

A partir do momento que um indivíduo acumula determinadas alterações metabólicas, pode-se dizer que este tem síndrome metabólica (SAKLAYEN et al., 2018).

A conjunção de fatores, que define se um indivíduo tem síndrome metabólica, varia entre diferentes organizações, mas os quesitos mais utilizados em pesquisas são: a definição feita pela *World Health Organization*, em 1999, a estipulada pelo *National Cholesterol Education Program*, ATP3, em 2005 e a estabelecida pela *International Diabetes Federation*, em 2006. O **Quadro 1** apresenta os parâmetros considerados por estas instituições para o estabelecimento do diagnóstico de síndrome metabólica (SAKLAYEN et al., 2018).

Quadro 1. Síndrome metabólica, definição.

WHO (1999)	NCEP ATP3 (2005)	IDF (2006)
Presença obrigatória de resistência à insulina ou glicose > 110 mg/dl, glicose 2 horas > 140 mg/dl. Além de duas ou mais das seguintes condições: 1. Colesterol HDL < 35 mg/dl (homens) ou < 40 mg/dl (mulheres); 2. Triglicerídeos > 150 mg/dl 3. Razão cintura/quadril > 0,9 (homens) ou > 0,85 (mulheres) ou IMC > 30 4. Pressão sanguínea > 140/90 mmHg.	Presença de três ou mais dos seguintes itens: 1. Glicemia no sangue maior que 100 mg/dl ou tratamento medicamentoso para glicemia elevada; 2. Colesterol HDL < 40 mg/dl (homens) ou < 50 mg/dl (mulheres) ou tratamento medicamentoso para HDL-C baixo; 3. Triglicerídeos no sangue > 150 mg/dl ou tratamento medicamentoso para triglicerídeos elevados; 4. Cintura > 102 cm (homens) ou > 88 cm (mulheres) 5. Pressão arterial > 130/85 mmHg ou tratamento medicamentoso para hipertensão.	Cintura > 94 cm (homens) ou > 80 cm (mulheres), juntamente com a presença de dois ou mais dos seguintes itens: 1. Glicemia no sangue maior que 100 mg/dl ou diabetes diagnosticada; 2. Colesterol HDL < 40 mg/dl (homens) ou < 50 mg/dl (mulheres) ou tratamento medicamentoso para HDL-C baixo; 3. Triglicerídeos no sangue > 150 mg/dl ou tratamento medicamentoso para triglicerídeos elevados; 4. Pressão arterial > 130/85 mmHg ou tratamento medicamentoso para hipertensão.

World Health Organization (WHO), National Cholesterol Education Program (NCEP), International Diabetes Federation (IDF).

Fonte: Traduzido de Saklayen et al. (2018)

Assim, de forma geral, pode-se dizer que a síndrome metabólica é uma condição caracterizada pela presença de alterações que aumentam o risco cardiometabólico, como a presença de obesidade abdominal, hipertensão, hiperlipidemia e resistência à insulina.

2.1.1 Epidemiologia da síndrome metabólica

A prevalência da síndrome metabólica varia de acordo com gênero, idade, etnia/raça e conforme o critério escolhido para diagnóstico da condição. A condição acomete ao menos um quinto da população dos Estados Unidos da América e aproximadamente um quarto da população europeia (ROCHLANI et al., 2017). Já no Brasil, é estimado que 29,6% da população tenha síndrome metabólica (VIDIGAL et al., 2013).

O excesso de peso e o acúmulo de gordura corporal acarreta alterações metabólicas, portanto, comumente a prevalência de síndrome metabólica corresponde

à de obesidade, já que essas duas condições estão intimamente correlacionadas (BUZZETTI et al., 2016; ROCHLANI et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a obesidade é uma doença crônica não transmissível e, atualmente, é um dos maiores desafios a ser enfrentado, principalmente por países desenvolvidos (WHO, 2016).

No ano de 2014, o excesso de peso estava presente em cerca de 39% das pessoas do mundo com mais de 18 anos ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$). Entre a década de 1980 e 2014 o número de obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) praticamente dobrou (WHO, 2016). Segundo relatório realizado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e Organização Pan-americana de Saúde, aproximadamente 360 milhões de latino-americanos e caribenhos estão com sobrepeso (58% da população), enquanto o número de obesos chega a 23%, totalizando 140 milhões de pessoas (FAO; OPAS, 2017). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, em 2019, 63,7% dos homens de Campo Grande estavam acima do peso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), estabelecendo a capital Sul-Mato-Grossense como primeira colocada entre as capitais brasileiras, nesse quesito. Neste mesmo período, o número de mulheres acima do peso foi de 52,9% (BRASIL, 2020).

2.1.2 Fisiopatologia da síndrome metabólica

Conforme abordado anteriormente, a síndrome metabólica é composta por diferentes alterações. Assim, o mecanismo patogênico exato é complexo e ainda não foi totalmente elucidado. Atualmente, ainda se é discutido se as alterações que compõem a síndrome metabólica apresentam manifestações patológicas distintas, ou se são manifestações de um mecanismo patológico comum (ROCHLANI et al., 2017).

Os estudos epidemiológicos e a discrepância na incidência da síndrome metabólica em diferentes regiões, demonstram a importância que o estilo de vida e os fatores ambientais podem ter na gênese da condição. Nesse sentido, sugere-se que o excesso de calorias consumidas e a falta de atividade física estão entre os principais fatores contribuintes (ROCHLANI et al., 2017).

Segundo a Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, o ganho de peso está correlacionado com o estilo de vida vigente na atualidade. Alterações socioeconômicas têm levado a população a consumir alimentos densamente calóricos, realizar maior número de refeições fora de casa e se

alimentar em menos tempo. Este contexto está correlacionado com alterações na regulação fisiológica da saciedade, e outras alterações metabólicas que contribuem para a gênese da obesidade (ABESO, 2016).

Entretanto, cabe salientar que, embora o peso corporal total IMC sejam fatores fortemente correlacionados a existência de alterações relacionadas à Síndrome Metabólica, existem indivíduos obesos que não possuem as alterações características da síndrome metabólica e, em contrapartida, alguns indivíduos eutróficos tem síndrome metabólica (WILDMAN et al., 2008).

Conforme demonstrado por Wildman et al. (2008), de acordo com os parâmetros da *National Cholesterol Education Program* (ATP3 - 2005), existe um subconjunto de indivíduos com sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $<30 \text{ kg/m}^2$) e obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) que possuem níveis séricos de glicose, pressão arterial e perfil lipídico dentro dos padrões considerados normais, mesmo sem a utilização de medicamentos específicos para controlar alterações nestes parâmetros. Em contrapartida, parte dos indivíduos eutróficos ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$) são metabolicamente anormais (WILDMAN et al., 2008).

Portanto, embora o peso possua correlação com alterações metabólicas, na prática clínica, é importante considerar que esse parâmetro, *per se*, pode não acarretar alterações metabólicas (BRADSHAW et al., 2013).

Mas, sem dúvida, o excesso de peso é um dos principais fatores que levam a disfunções presentes na síndrome metabólica. Indivíduos obesos possuem quatro vezes mais chance de desenvolverem alterações metabólicas do que eutróficos (BRADSHAW et al., 2013).

Além do peso total, o ganho de peso pode ser um fator determinante. Indivíduos saudáveis que ao longo de 9 anos ganharam peso, apresentaram maior probabilidade de desenvolver alterações metabólicas, do que indivíduos obesos com peso constante. Ou seja, o ganho de peso em indivíduos adultos representa um risco para desenvolvimento de alterações metabólicas, independente do IMC (BRADSHAW et al., 2013).

A obesidade possui causas etiológicas multifatoriais sendo influenciada por: características genéticas, alimentação, estilo de vida, fatores emocionais e fatores ambientais que cercam o paciente (HRUBY; HU, 2014).

A obesidade é caracterizada pelo excesso de peso em relação à altura, com acúmulo de gordura principalmente na região abdominal. Frequentemente é

acompanhada de inflamação crônica sistêmica de baixo grau e pode gerar complicações como: diabetes tipo II, cânceres, doenças cardiovasculares, DHGNA e outras patologias. Devido a ampla gama de comorbidades e alterações metabólicas a doença se tornou um problema mundial de saúde pública (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Além disso, a obesidade é a maior causa de doenças e mortes e que poderiam ser evitadas em todo o mundo (HRUBY; HU, 2014).

Para entender como o excesso de peso pode passar a ser patológico, acarretando nas alterações relacionadas à síndrome metabólica, primeiro é preciso compreender as características do tecido adiposo.

2.1.2.1 Características e funções do tecido adiposo

O indivíduo obeso possui excesso de gordura corporal, que é caracterizado pelo acúmulo de triglicerídeos, predominantemente, nos adipócitos. O tecido adiposo (TA) é um órgão endócrino que, em condições normais, é um dos principais responsáveis pela homeostase energética em mamíferos (VEGIOPOULOS et al., 2017).

Os seres humanos possuem tecido adiposo por todo corpo, porém, com diferentes composições. O tecido adiposo marrom é relacionado à oxidação de lipídeos e termorregulação, processo regulado pela expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), que influencia a dissipação de energia pelo desacoplamento da atividade da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, motivo pelo qual esse tecido possui esta organela em abundância (CAPUTO, 2017). Já o tecido adiposo branco, é o principal local de armazenamento de lipídeos na forma de triglicerídeos e possui importante função endócrina, capaz de regular o armazenamento e mobilização de energia em diversos tecidos (CAPUTO, 2017).

Atualmente, estudos relatam a capacidade de “escurecimento” do tecido adiposo branco, que pode mudar sua característica primordial, se tornando tecido adiposo bege ou similar a marrom e passando a ter características termogênicas (HU et al., 2017; TAMUCCI et al., 2017; THYAGARAJAN et al., 2017). Os dois depósitos mais abundantes de tecido adiposo branco são: o subcutâneo e o visceral, sendo que, o último possui maior relação com o metabolismo hepático, pois secreta adipocinas na circulação porta, enquanto as adipocinas secretadas pelo primeiro entram diretamente na circulação sistêmica (CAPUTO, 2017; OUCHI, 2011).

A capacidade de adipócitos armazenarem substratos em situações de superávit calórico e poderem liberá-los no estado de déficit é um mecanismo importante para sobrevivência. Dada esta relevância, o armazenamento e a liberação de lipídeos no TA é um processo intimamente controlado por hormônios. No estado pós-prandial, a insulina promove o armazenamento de triglicerídeos em organelas denominadas gotículas lipídicas (GLs), ao passo que, em jejum, catecolaminas desencadeiam o processo de lipólise, com conseqüente liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea (CAPUTO, 2017; OUCHI, 2011).

Os ácidos graxos liberados na corrente sanguínea, podem servir de substrato energético para diversos tecidos ou, caso não sejam utilizados, são novamente ligados ao glicerol, formando triacilgliceróis – também denominados: triglicerídeos. Em geral, os triglicerídeos são formados nos adipócitos e hepatócitos pelo empacotamento de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol. Os ácidos graxos são obtidos a partir da dieta ou pela via metabólica denominada lipogênese *de novo* – processo que converte carbonos advindos de carboidratos em ácidos graxos – que ocorre principalmente no tecido adiposo e fígado e, por fim, são armazenados dentro das GLs (VEGIOPOULOS et al., 2017).

As GLs são organelas encontradas em quase todos os organismos, de bactérias a células de mamíferos (ONAL et al., 2017). Sua formação inicia-se na bicamada fosfolipídica do retículo endoplasmático, onde, enzimas como a diacilglicerol O-aciltransferase 1 (DGAT1) e glicerol-3-fosfato aciltransferase 4 (GPAT4), sintetizam triglicerídeos. Com o acúmulo de lipídeos, a membrana do retículo endoplasmático passa a uma conformação em forma de esfera até que, ao alcançar determinado tamanho, se desprende do retículo endoplasmático formando uma gotícula lipídica composta externamente por uma camada única de fosfolipídios e internamente por triglicerídeos, diglicerídeos, ceramidas e ésteres de colesterol (GLUCHOWSKI et al., 2017; MORALES; BUCAREY; ESPINOSA, 2017).

As GLs são consideradas organelas dinâmicas, pois possuem maquinaria celular específica para controle de sua biologia (GLUCHOWSKI et al., 2017). Dentre as proteínas que compõem as GLs nos hepatócitos, destaca-se a Perilipina (PLIN2), cuja expressão está aumentada na DGHNA (CARR; AHIMA, 2016). Essa proteína é relacionada a formação das GLs e, camundongos nocauteados para expressão de PLIN2, possuem resistência a obesidade e DHGNA induzida por dieta hipercalórica (CARR; AHIMA, 2016; ITABE et al., 2017; LIBBY et al., 2016). A expressão de PLIN2

mRNA é regulada pelo PPAR- α , PPAR- γ , pelo RXR, SREBP-1 e SREBP-2 (ITABE et al., 2017, LIBBY et al., 2016).

O processo de acúmulo de triglicerídeos nas gotículas lipídicas permite o estoque de fontes energéticas, sendo fundamental para sobrevivência, principalmente em períodos de escassez de alimento. Porém, quando em excesso, esse processo pode se tornar patológico devido a disfunção do tecido adiposo e, conseqüentemente, levando a alterações metabólicas.

2.1.2.2 Disfunção do tecido adiposo

A obesidade é uma doença multifatorial, mas o aumento da gordura visceral acompanhado de disfunção do tecido adiposo e a inflamação crônica sistêmica de baixo grau, podem ser os gatilhos iniciais que acarretam outras alterações relacionadas à síndrome metabólica (MATSUZAWA; FUNAHASHI; NAKAMURA, 2011).

Ainda é incerto o gatilho exato que leva ao surgimento da inflamação crônica sistêmica de baixo grau. O que é certo é que a inflamação está intimamente correlacionada com a obesidade e que, quanto maior a inflamação, maior é a resistência à insulina e a incidência de diabetes tipo 2 (REILLY et al., 2017).

Dentre os possíveis gatilhos que desencadeiam a inflamação destacam-se: antígenos advindos da microbiota intestinal, excesso de caloria, lipídeos da dieta ou endógenos; morte de adipócitos e o estresse mecânico (REILLY et al., 2017). Todos estes gatilhos são fatores importantes que levam a desregulação do tecido adiposo.

A desregulação do tecido adiposo pode ocorrer por diferentes mecanismos. O estilo de vida e o padrão alimentar pode acarretar alterações epigenômicas e nutrigenômicas, com conseqüente aumento da inflamação, redução da capacidade de β -oxidação, aumento da lipogênese, aumento do estresse oxidativo, aumento da permeabilidade intestinal, alterações na microbiota intestinal, desregulação hormonal e acúmulo excessivo de triglicerídeos nas gotículas lipídicas, com conseqüente hipertrofia dos adipócitos (**Figura 1**). Todos esses fatores, em conjunto, podem contribuir para que o excesso de peso se torne patológico (LONGO et al., 2019).

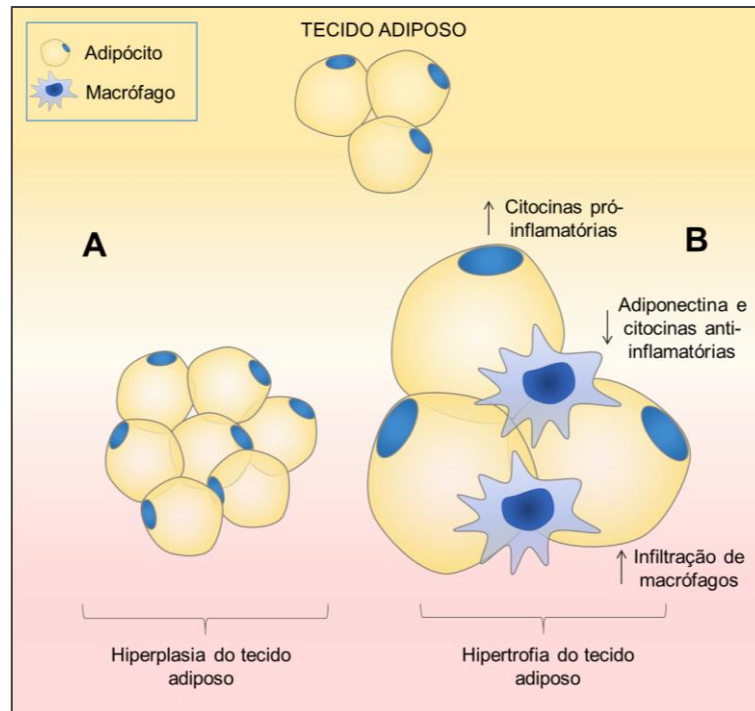


Figura 1. Resposta do tecido adiposo ao balanço energético positivo. a) Os pré-adipócitos, em resposta a um excedente calórico, se transformam em adipócitos maduros. A hiperplasia do tecido adiposo, está relacionada a menor resistência à insulina e inflamação. b) Em resposta a um excedente calórico, os adipócitos se hipertrofiam. Esta resposta está associada a maior infiltração e ativação de macrófagos, aumento de citocinas pró-inflamatórias, redução de citocinas anti-inflamatórias, resistência à insulina e inflamação crônica sistêmica de baixo grau.

Fonte: Elaboração própria

A hipertrofia dos adipócitos associada a outros fatores comumente presentes nos indivíduos com síndrome metabólica, como o aumento da permeabilidade intestinal e consequente translocação de lipopolissacarídeos advindos da microbiota, contribuem para inflamação do tecido adiposo, conforme apresentada na Figura 2.

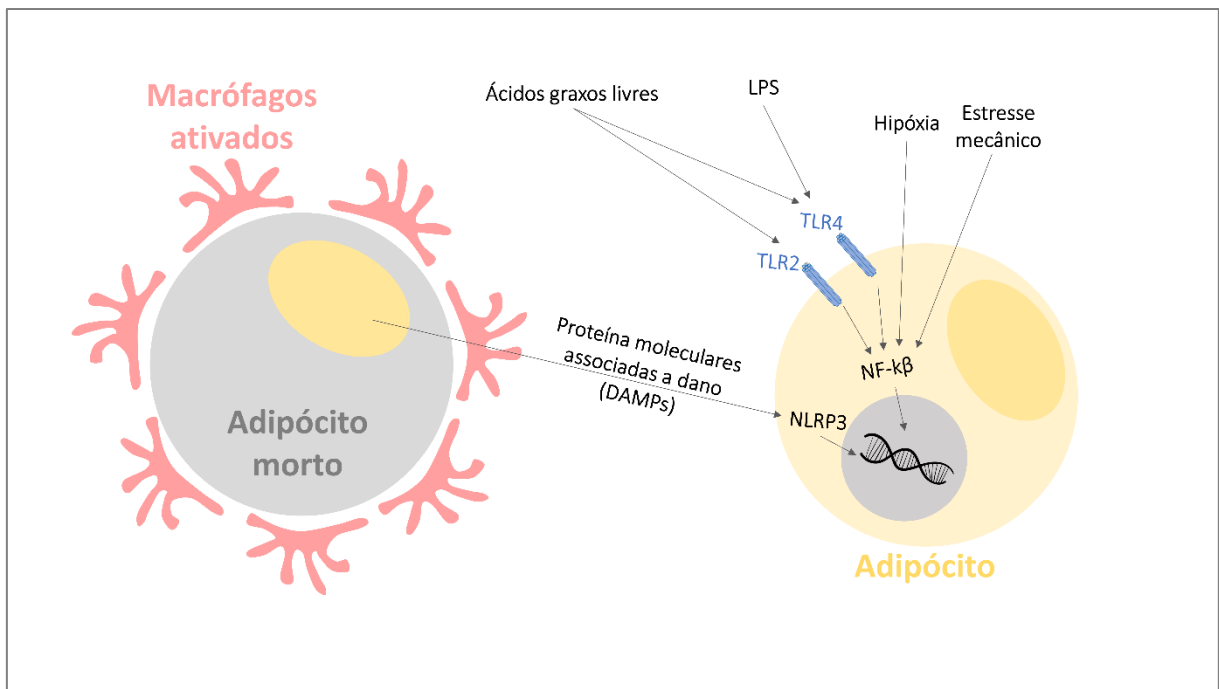


Figura 2. Tecido adiposo disfuncional. A hiperplasia dos adipócitos resulta na obstrução de vasos sanguíneos, comprometendo a entrega de oxigênio às células e, conseqüente, levando a morte de adipócitos, que passam a liberar proteínas moleculares associadas a dano (DAMPs). Os DAMPs ativam o domínio da pirina da família NLR contendo 3 (NLRP3), que aumenta a transcrição de genes relacionados à inflamação. A inflamação também é estimulada pela ativação do fator nuclear kappa β (NF- κ β). Os lipopolissacarídeos (LPS) derivados da microbiota intestinal ativam este fator após serem reconhecidos nos receptores do tipo toll 4 (TLR4). Também, após interceptados pelo receptor do tipo toll 2 e 4, os ácidos graxos livres presentes na corrente sanguínea realizam a mesma sinalização. Além disso, a hipoxia e o estresse mecânico também podem ser fatores que aumentam a atividade do NF- κ β .

Fonte: Adaptado de Reilly et al. (2017)

Portanto, tanto os fatores relacionados com a hipertrofia do tecido adiposo, quanto outras sinalizações, como o influxo de lipopolissacarídeos e os ácidos graxos livres, contribuem para inflamação do tecido.

As citocinas inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo vão para corrente sanguínea e chegam ao fígado. Além destas moléculas inflamatórias, as células hepáticas também interceptam padrões moleculares associados a patógenos advindos da microbiota intestinal, ácidos graxos livres advindosmmda dieta e da lipólise no tecido adiposo e, principalmente devido à resistência à insulina, ocorre maior influxo de glicose e insulina ao órgão. Em conjunto estas alterações irão modular a o funcionamento de fatores de transcrição nuclear, a produção de matriz extracelular fibrótica e contribuem para a DHGNA, conforme explicado com mais detalhes no **Apêndice 1**.

2.2 MARCADORES ASSOCIADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Conforme apontado no Quadro 1, a síndrome metabólica é definida de acordo com uma conjunção de fatores como: os níveis de glicose, colesterol HDL, triglicérides, pressão arterial e circunferência da cintura. Neste sentido, pesquisas tem estudado diferentes biomarcadores úteis na avaliação do risco para desenvolvimento de síndrome metabólica e DHGNA.

2.2.1 Resistência à insulina

Por mais que o exato mecanismo que leva à resistência à insulina ainda seja incerto, é proposto o estresse oxidativo e a inflamação do tecido adiposo e hepático leve a ativação da via da quinase N-terminal c-Jun (JNK) que inibi a sinalização feita pelo substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), reduzindo o translocamento do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para membrana celular e, consequentemente, reduzindo a captação de glicose. Com menos glicose sendo captada, maior é sua concentração sérica estimulando o pâncreas a continuar secretando insulina na corrente sanguínea. Portanto, o estresse oxidativo e a inflamação contribuem para o quadro de resistência à insulina, o que pode levar ao aumento da glicemia e insulina sanguínea, também alterando marcadores como a hemoglobina glicada, frutossamina e peptídeo C (PAHLAVANI et al., 2017; ZATTERALE et al., 2020).

2.2.1 Circunferência da cintura

Vázquez et al. (2019), demonstraram que, mesmo em indivíduos clinicamente saudáveis e não obesos, a circunferência da cintura está correlacionada com fatores de risco cardiometabólico como: LDL oxidado, triglicérides, VLDL, colesterol total e receptor expresso por células mieloides 1 (sTREM-1) (biomarcador correlacionado a maior risco aterosclerótico e inflamação crônica sistêmica). Portanto, a alteração deste parâmetro é uma forma prática e viável para o controle e prevenção de doenças cardiovasculares (VÁZQUEZ et al., 2019).

2.2.2 Alanina Aminotransferase e aspartato aminotransferase

A Alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima responsável por catalisar a transaminação de alanina e 2-cetoglutarato em piruvato e glutamato. Quando comparado a outros tecidos, esta proteína é expressa em grande quantidade no fígado. A presença de lesão nas células hepáticas, causa consequente extravasamento de ALT, aumentando os níveis séricos da enzima. Por esse motivo é comumente utilizada como marcador para indicar a inflamação e lesão hepática (PRATT et al., 2000).

Embora possua boa especificidade correlacionada a injúria hepática, alguns autores indicam que é possível a existência de dano ao fígado mesmo com níveis de ALT dentro dos valores de referência até hoje estabelecidos (ZELBER-SAGI et al., 2006). Zelber-sagi et al. (2006) demonstraram que valores de ALT dentro dos valores de referência, não foi capaz de predizer a existência de DHGNA, entretanto a ALT em níveis acima de 19,5 U/L possui capacidade de predizer a DHGNA com 72% de sensibilidade e 60% de especificidade. Os autores ainda evidenciaram que pacientes com níveis altos de ácido úrico e concomitantemente elevados níveis de ALT, possuem 27 vezes maior prevalência de DHGNA, do que paciente com baixos níveis de ácido úrico e ALT, após ajuste para sexo e idade. Essa predição também se manteve após ajuste para outras variáveis, com *odds ratio* de 10,8 (95% CI 3,56–32,5) para homens e 7,96 (95% CI 2,83–22,4) para mulheres.

Além da ALT, pacientes com síndrome metabólica e DHGNA também podem apresentar níveis elevados de aspartato aminotransferase (AST) e de gamaglutamiltransferase (GGT) (CLARK; BRANCATI; DIEHL, 2003). A elevação destes marcadores são um indicativo de possível dano hepático e podem ser utilizados para cálculo de estimativas do nível de lesão hepática através de parâmetros como o *NAFLD fibrosis score*, o *FIB-4 score* ou o *BARD score* (ANGULO et al., 2007; CICHOS-LACH et al., 2012).

2.2.3 Ácido úrico

O ácido úrico ainda é considerado por alguns apenas como o produto do metabolismo das purinas em humanos, entretanto seu potencial como antioxidante fisiológico é conhecido há anos (YU et al., 1994). Devido a essa capacidade em

combater os radicais livres, os níveis séricos de ácido úrico podem se elevar como mecanismo compensatório em situações de elevado estresse oxidativo, estando correlacionado à resistência à insulina (**Figura 3**) e condições presentes na síndrome metabólica (ISHIZAKA et al., 2005).

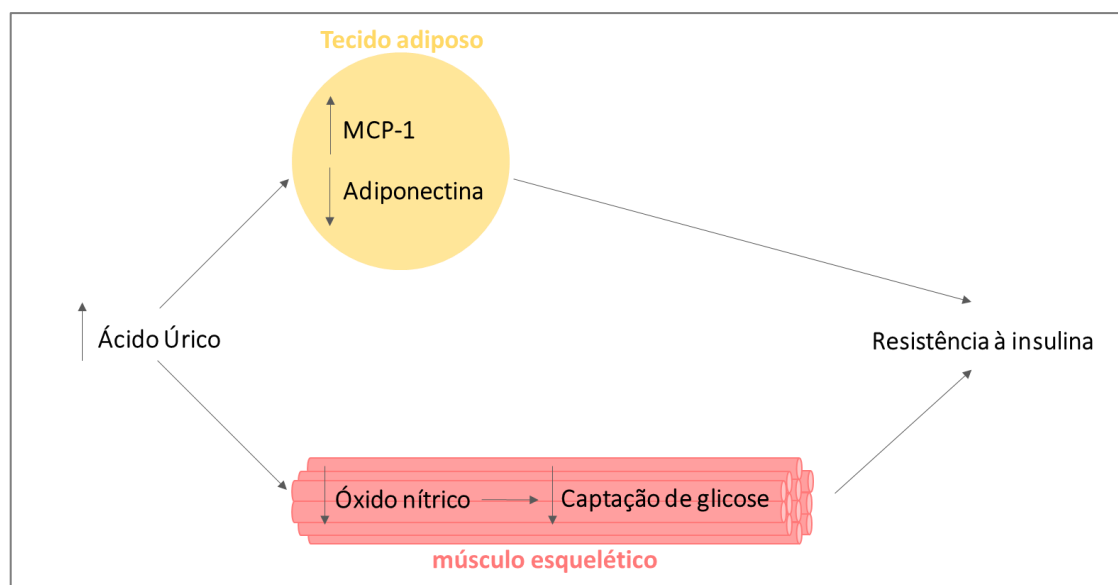


Figura 3. Mecanismo básico que acarreta o aumento da resistência à insulina após elevação nos níveis séricos de ácido úrico. O ácido úrico sérico aumenta como resposta a uma maior quantidade de estresse oxidativo. No tecido adiposo, essa elevação causa maior expressão citocinas pró-inflamatórias como a MCP-1 e menor de citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, contribuindo para aumento da inflamação. Além disso, posteriormente, a elevação nos níveis de ácido úrico causa redução nas quantidades de óxido nítrico e consequente menor captação de glicose nas células musculares. Em conjunto, esses fatores contribuem para instauração da resistência à insulina. *Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1)*.

Fonte: Elaboração própria a partir de informações contidas em Keenan et al. (2012)

Vários estudos têm demonstrado que a elevação do ácido úrico pode ser um fator correlacionado ou preditivo de comorbidades. Ishizaka et al. (2005) demonstraram que a prevalência de síndrome metabólica aumenta conforme maiores níveis de ácido úrico, tanto em homens como em mulheres.

Com relação a problemas cardiovasculares, uma elevação no nível de ácido úrico se apresentou como fator independente para prever a incidência de placa na artéria carótida, em homens (ISHIZAKA et al., 2005). Além disso, Pacifico et al. (2009) validaram a correlação entre a hiperuricemia e a espessura íntima-média da carótida em crianças obesas, independentemente da existência de outros fatores de risco associadas a síndrome metabólica, concluindo que o exame de ácido úrico pode ser uma bom parâmetro para indicar sinais precoces de aterosclerose.

Em um estudo com 356 crianças com obesidade, para as com 10 anos de idade ou menos, os níveis séricos de GGT e ácido úrico apresentaram capacidade de prever a incidência de DHGNA, sendo que, elevações nos níveis de GGT aumentaram em 1,2 vezes o risco de desenvolvimento da doença, enquanto as crianças com maiores quantidades de ácido úrico apresentaram 1,4 vezes maior chance de desenvolver DHGNA (KIM et al., 2018).

Para adultos em situação de risco cardiometabólico, os níveis de ácido úrico eram maiores naqueles com síndrome metabólica ($5,1 \pm 1,6$ mg/dL), do que quando comparado aos que tinham pré-síndrome ($4,1 \pm 1,3$ mg/dL) ou sem síndrome metabólica ($3,9 \pm 1,2$ mg/dL), indicando que o ácido úrico pode ser um bom biomarcador em pacientes com risco cardiometabólico (SILVA et al., 2015).

Os valores de ácido úrico também estão correlacionados com a incidência de DHGNA em indivíduos sem obesidade ou síndrome metabólica. Em um estudo realizado com 3518 indivíduos brasileiros, Keenan et al. (2012) demonstraram que níveis mais altos de ácido úrico foram associados a valores de proteína C-reativa ultrasensível ≥ 3 mg/dL, relação triglicerídeos/HDL ≥ 3 e esteatose hepática, independente da presença de síndrome metabólica e obesidade.

Além da associação com a síndrome metabólica, estudos observacionais também mostram a correlação entre os níveis séricos de ácido úrico e a DHGNA. Nesse sentido, para testar se os níveis de ácido úrico são simplesmente uma causa da DHGNA ou se esse marcador possui alguma utilidade preditiva, Xu et al. (2010) acompanharam 6890 indivíduos por 3 anos, no qual 11,80% desenvolveram DHGNA até o final do estudo. Os autores verificaram que 7,2% dos indivíduos do primeiro quintil de ácido úrico desenvolveram DHGNA, contra 9,5%, 11,5%, 13,8% e 17,2% do segundo, terceiro, quarto e quinto quintil, respectivamente. Mesmo quando a regressão foi ajustada para idade, sexo e síndrome metabólica, o nível sérico de ácido úrico ainda se mostrou um parâmetro independente para desenvolvimento de DHGNA, ao ponto que, quando comparados ao primeiro quintil, os indivíduos do segundo, terceiro, quarto e quinto quintil apresentaram 18%, 32%, 39% e 50% maior chance de desenvolver a doença.

O mecanismo que explica a relação entre o ácido úrico e o acúmulo de gordura hepática está descrito na **Figura 4** abaixo.

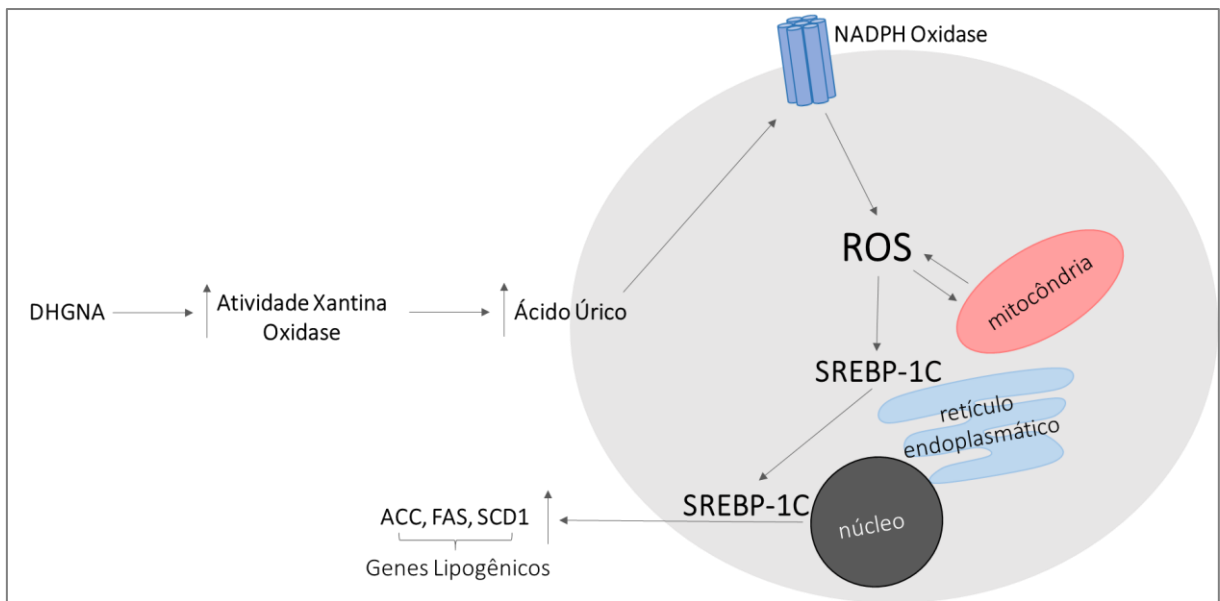


Figura 4. Ácido úrico e estresse oxidativo. Pacientes com DHGNA possuem maior atividade da enzima Xantina Oxidase, que converte Xantina em ácido úrico. A elevação dos níveis de ácido úrico induz a ativação da NADPH Oxidase, causando estresse oxidativo, que leva a clivagem do SREBP-1c do retículo endoplasmático, que conseqüentemente, se desloca para o núcleo aumentando a expressão de genes lipogênicos como, ACC, FAS e SCD1. Além disso, o estresse oxidativo causado pela NADPH Oxidase, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria, outro fator relacionado ao acúmulo de gordura hepática. Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA), *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c), Acetil-CoA carboxilase (ACC), *Fatty acid synthase* (FAS), *Stearoyl-CoA desaturase* (SCD1).

Fonte: Adaptado de Choi et al. (2014)

O nível de ácido úrico também apresentou capacidade de prever a existência de DHGNA diagnosticada por ultrassonografia em um estudo realizado com 1365 indivíduos chineses, mesmo após o ajuste para resistência à insulina, componentes relacionados à síndrome metabólica e outros possíveis fatores conflitantes (LIU et al., 2016).

2.2.4 Colesterol e triglicerídeos

Vários fatores contribuem para o aumento dos triglicerídeos, colesterol LDL e redução do colesterol HDL no indivíduo com síndrome metabólica. Conforme já descrito a inflamação crônica sistêmica acarreta resistência à insulina. O mau funcionamento da insulina contribui para que o tecido adiposo não reduza a lipólise, liberando constantemente ácidos graxos na corrente sanguínea. Além disso, o aumento da insulina e glicose intensificam a atividade de fatores de transcrição como o SREBP-1c e a proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos (ChREBP), que regulam a expressão de genes de enzimas lipogênicas, aumentando a lipogênese

de novo. Assim, o influxo de ácidos graxos ao fígado é alto e satura a capacidade de oxidação de gordura nos hepatócitos, levando a lipotoxicidade e aumento do estresse oxidativo (**Figura 5**) (KOLOVOU et al., 2005; PERLA et al., 2017).

A exportação de lipídeos via VLDL também é reduzida, este fato ocorre, pois, com o aumento intra-hepático dos triglicerídeos, os hepatócitos passam a inserir mais lipídeos nas VLDLs, fazendo com que estas excedam o diâmetro dos poros endoteliais sinusoidais, ou seja, se tornam grandes demais para conseguirem ser exportadas para corrente sanguínea e passam a se acumular no fígado (KOLOVOU et al., 2005; PERLA et al., 2017).

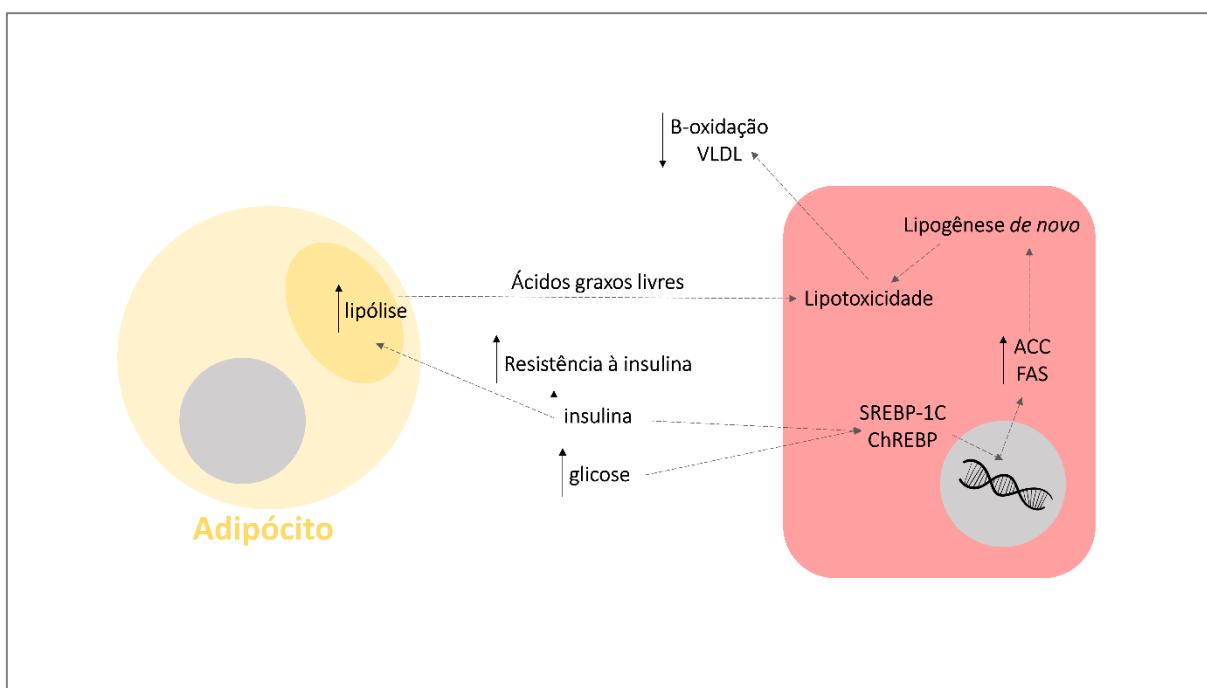


Figura 5. Lipotoxicidade na síndrome metabólica e doença hepática gordurosa não alcoólica.
Fonte: Elaboração própria

Com aumento dos triglicerídeos, o colesterol HDL também é afetado. Isto ocorre, pois, a proteína de transferência de colesterol éster aumenta a transferência de triglicerídeos para o HDL que, conseqüentemente, se torna um HDL rico em triglicerídeos, o que o torna mais apto a ser catabolizado. Além disto, é hipotetizado que ocorra redução da produção de apo A no fígado, reduzindo a formação de novas HDL (KOLOVOU et al., 2005).

2.3 ESTUDOS ANIMAIS COM ÓLEOS PARA O TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA

Conforme apresentado nas seções anteriores, a síndrome metabólica possui etiologia multifatorial e, um dos fatores importantes na atenuação da doença é o padrão alimentar (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Nesse sentido, pesquisadores têm testado a capacidade da suplementação de diferentes óleos, em atenuar as alterações metabólicas causadas por uma dieta hipercalórica.

Lai et al. (2016), estudaram o efeito do óleo de gengibre e citral (um dos principais componentes do óleo de gengibre) em camundongos, e demonstraram que o óleo possui potencial hepatoprotetor contra os efeitos da DGHNA induzida por dieta hiperlipídica.

Yu et al. (2017), apontaram que o óleo de microalga foi capaz de reduzir a gordura abdominal e os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol, e lipoproteína de baixa densidade (LDL), em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Lai et al. (2014), verificaram que o óleo de alho foi capaz de proteger camundongos contra os efeitos da DGHNA induzida por dieta hiperlipídica, inflamação, e dano oxidativo.

Park et al. (2016), atestaram que o óleo de pinhão foi capaz de reduzir o aumento de peso e tecido adiposo e reduzir os níveis hepáticos de triglicerídeos, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, de acordo com Zhu et al. (2016), o óleo de pinhão, através da regulação gênica, aumenta o metabolismo hepático de triglicerídeos, a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias e previne a formação de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL).

Yang et al. (2016), aferiram que o óleo de krill foi capaz de reduzir cerca de 15% do peso ganho por camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, além de proporcionar redução da esteatose hepática, reduzir os níveis séricos de triglicerídeos, LDL e regular genes relacionados ao metabolismo lipídico e glicídico.

Lee et al. (2016), apontaram que o óleo da semente de framboesa preta reduziu os níveis de ácidos graxos hepáticos e de fatores inflamatórios e aumentou a expressão de genes que codificam proteína anti-inflamatórias.

D'Espessailles et al. (2015) e Dossi et al. (2017), demonstraram que, o óleo de rosa mosqueta apresentou potencial de prevenção da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica, em camundongos.

Assim, devido a sua composição, o óleo da polpa de buriti emerge com um alimento com potencial funcional. Os principais componentes do óleo são: ácido oleico (72,6 - 78,7%) e o ácido palmítico (19,2 - 19,6%) (ALBUQUERQUE et al., 2005; AQUINO et al., 2012; MEDEIROS et al., 2015). Além disso, o buriti é reconhecido como fonte de carotenóides. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), listou o uso do buriti para suprir deficiências nutricionais em comunidades carentes da Amazônia (FILHO; LIMA, 2001). Também foi demonstrado que a ingestão de doce de buriti por 20 dias por crianças de 3 a 12 anos foi capaz de eliminar sintomas relacionados à deficiência de vitamina A.

2.4 BURITI (*MAURITIA FLEXUOSA*)

O buriti é um fruto nativo do cerrado brasileiro, possui epicarpo escamado de coloração amarronzada (**Figura 6**) e mesocarpo alaranjado, que é a parte costumeiramente consumida. É ingerido *in natura* ou pós processado como doce, vinho, geladinho, sorvete, picolé, óleo para tempero ou como óleo para fritura (CYMERYS, 2005).



Figura 6. Fruto de Buriti (*Mauritia flexuosa*)

O fruto tem aproximadamente 5,5 cm de comprimento, 4,5 cm de diâmetro e peso médio de 65 g, porém essas medidas variam conforme a localidade e época de coleta (ROSSI, *et al.*, 2014). Sua polpa é rica em ácido oleico, tocoferóis e carotenoides, e é tradicionalmente consumido pela população local de Mato Grosso do Sul e outros estados brasileiros.

A quantidade de micronutrientes, macronutrientes e compostos bioativos dos alimentos pode variar de acordo com a época do ano, o solo, a quantidade de chuvas, e outros fatores, bem como, após a colheita, de acordo com pós-processamento do alimento (PARADA; AGUILERA, 2007). Dessa forma, é esperada variação entre diferentes pesquisas que se propuseram a estudar as características físico e químicas de alimentos.

Sandri *et al.* (2017) estudaram as características físico-químicas e atividade antioxidante da polpa de Buriti. O fruto foi coletado na cidade de Diamantino, Mato Grosso. O resultado das análises mostrou que a polpa apresentou maior quantidade de lipídeos (20,92%) e fibras (8,56%), enquanto a quantidade de carboidratos total foi de 7,28% e de proteína 2,97%. O valor energético total foi de 229,28 kcal a cada 100g de polpa.

A polpa do Buriti é rica em lipídeos e é a principal parte consumida pela população. Santos *et al.* (2017), coletaram frutos de Buriti nos meses de janeiro e fevereiro de 2009 e 2010 em diferentes cidades do estado do Amapá, na Amazônia brasileira. As análises foram feitas no mesocarpo (polpa) do fruto, que apresentou 83,16% (± 2.1) de ácido oleico e 16,84% (± 2.3) de ácido palmítico.

O óleo de Buriti vendido comercialmente em Beraca Sabará (São Paulo, Brasil) apresentou 74,21% de ácido oleico e 19,81% de ácido palmítico. O óleo também apresentou quatro isômeros de tocoferol sendo o total (Σ tocoferóis) de 122,2 mg/kg⁻¹. O óleo de buriti também é uma das maiores fontes conhecidas de carotenoides, apresentando 2.786,83 mg/g⁻¹ de β -caroteno (SPERANZA *et al.*, 2018). No estudo realizado por Sandri *et al.* (2017), a polpa de Buriti apresentou 9.098 μ g/100g de β -caroteno e 10.086 μ g/100g de α -caroteno.

Portanto, o perfil de ácidos graxos do óleo de Buriti é semelhante ao do azeite de oliva. Estudos prévios, indicam que esse perfil de ácidos graxos pode ser benéfico na prevenção da obesidade e da DGHNA. Os pesquisadores Juradoruiz *et al.* (2016), estudaram a capacidade do azeite de oliva – rico em ácido oleico – em reverter a inflamação e DGHNA, em camundongos C57bl/6J, causada previamente por uma

dieta rica em banha de porco. Os autores concluíram que a troca de ácidos graxos saturados por azeite de oliva foi capaz de reverter a DGHNA induzida pela dieta hiperlipídica.

Xiao *et al.* (2019), demonstraram que a existência de maiores concentrações séricas de carotenoides esteve favoravelmente associada a melhora na DHGNA. Além da importância dos carotenoides, uma meta-análise feita por Sato *et al.* (2015), demonstrou que a Vitamina E (tocoferol), está associada com melhora significativa do funcionamento do fígado e mudanças histológicas, em pacientes com DGHNA.

Desta forma, as características nutricionais do óleo da polpa de buriti elencam a hipótese de que seu consumo pode ser potencialmente benéfico para pacientes com síndrome metabólica e justificam o objetivo desta pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência do óleo da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*), nos marcadores metabólicos relacionados à obesidade, em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer, por meio de revisão da literatura, um padrão de delineamento experimental do modelo animal para avaliação da influência do óleo da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*), nos marcadores metabólicos relacionados à obesidade, em camundongos;
- Comparar o peso do tecido adiposo, hepático e corporal em camundongos alimentados ou não com óleo da polpa de Buriti;
- Analisar a influência do óleo da polpa de buriti na histologia do tecido adiposo, renal, pancreático e hepático, em camundongos.
- Contrastar os níveis séricos de glicose, proteínas totais, creatinina, colesterol total, albumina, ácido úrico, ureia, triglicerídeos, ALT e AST em camundongos alimentados ou não com óleo da polpa de Buriti;
- Distinguir a tolerância a glicose em camundongos alimentados ou não com óleo da polpa de Buriti;
- Diferenciar o estresse oxidativo no tecido adiposo e hepático em camundongos alimentados ou não com óleo da polpa de Buriti.

4 RESULTADOS

De acordo com o proposto no primeiro objetivo específico, foi realizada revisão bibliográfica para estabelecer um padrão de delineamento experimental do modelo animal para avaliação da influência do óleo da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*), nos marcadores metabólicos relacionados à obesidade, em camundongos.

Foram revisados experimentos que pesquisaram a influência da suplementação de lipídeos na doença hepática gordurosa não alcoólica induzida por dieta hiperlipídica, incluindo artigos publicados entre janeiro de 2014 e maio de 2019. As pesquisas foram feitas no camundongo C57bl/6. Desta forma, a revisão serviu como base para definição do delineamento experimental realizado no experimento desta tese.

Os resultados desta revisão geraram um artigo publicado no periódico NUTRIENTS da editora MDPI, qualis/CAPES A1 na área interdisciplinar (fator de impacto 4,171) e estão apresentados no **Apêndice 2**.

Os demais objetivos foram respondidos após a realização de um experimento animal em camundongos suplementados com óleo da polpa de buriti. Os resultados desse experimento estão no **Apêndice 3**, na forma de artigo intitulado “*Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in C57bl/6 mice*”, publicado no periódico *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Wiley - Online ISSN:1439-0396), fator de impacto 1,597, qualis/CAPES A2 (2019).

O perfil de ácidos graxos do óleo da polpa de buriti utilizado no experimento, foi publicado como informação suplementar no artigo “*Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in C57bl/6 mice*” e está disponível no final do **Apêndice 3**.

A composição completa das dietas utilizadas no experimento encontra-se no **Apêndice 4**.

Esta pesquisa foi devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o registro de número: AB4C726 (**Anexo 3**).

Uma cópia do registro na Comissão de Ética no Uso de Animais encontra-se no **Anexo 4**.

CONCLUSÃO

Concluimos que o óleo da polpa de buriti (*Mauriti flexuosa*), quando utilizado de forma preventiva, não foi capaz de atenuar as alterações metabólicas causadas por uma dieta hiperlipídica em camundongos C57bl/6 e ainda agravou alguns parâmetros relacionados à síndrome metabólica.

Quando comparados ao grupo controle obeso, o grupo que recebeu a suplementação de 100mg/Kg de óleo de polpa de buriti, apresentou maior acúmulo de gordura no renal, além de elevação nos níveis séricos de glicose em jejum, ácido úrico, colesterol total e triglicerídeos. Já o grupo que recebeu a suplementação de 50mg/Kg de óleo de polpa de buriti, teve aumento nos níveis de ácido úrico e maior tempo para retornar a glicemia basal no teste de tolerância oral à glicose.

Não podemos concluir o real motivo que levou a piora dos parâmetros analisados, mas supõe-se que a utilização de um óleo rico em antioxidantes como tocoferóis e betacarotenos, previamente ao estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo pronunciado, pode ter contribuído para o desbalanço da capacidade antioxidante própria dos camundongos.

Os resultados aqui destacados são referentes unicamente ao delineamento experimental utilizado nesta pesquisa, ou seja: suplementação do óleo bruto da polpa de buriti com utilização prévia ao estabelecimento da obesidade. Esses resultados não devem ser extrapolados para outras metodologias ou para o óleo refinado da polpa de buriti. Sugerimos que pesquisadores realizem futuras pesquisas com o óleo de buriti na forma refinada, além de considerar a utilização do óleo somente após a indução da obesidade.

Vale destacar, com relação aos resultados obtidos no artigos de revisão que, embora o modelo animal com utilização do camundongo C57bl/6 seja o mais comum em pesquisas relacionadas aos efeitos de lipídeos na DHGNA induzida por dieta hipercalórica, verificamos que não existe padrão em diversos aspectos relacionados ao delineamento experimental dessas pesquisas, como padronização em relação à: idade e quantidade de animais por grupo, tempo de adaptação, duração do experimento, quantidade de lipídios utilizados no tratamento, veículo utilizado para carrear o lipídeo em estudo e substância oferecida aos grupos controle.

REFERÊNCIAS

ABESO (São Paulo). Associação Brasileira Para O Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO**. 4. ed. São Paulo: Abeso, 2016. 188 p. Disponível em:

<<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fcc403e5da.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2019.

ALBUQUERQUE, Marcos L. S.; GUEDES, Ilde; ALCANTARA JUNIOR, Petrus; MOREIRA, Sanclayton G. C.; BARBOSA NETO, Newton M.; CORREA, Daniel S.; ZILIO, Sergio C.. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 1-10, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532005000700004>.

ANGULO, Paul *et al.* The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with nafld. **Hepatology**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 846-854, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.21496>. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.21496>. Acesso em: 1 jan. 2020.

AQUINO, Jailane de Souza *et al.* Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the brazilian cerrado: physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], p. 1-11, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532012000200004>.

ARD, Jamy D. *et al.* Nutrition Interventions for Obesity. **Medical Clinics Of North America**, [S.L.], v. 100, n. 6, p. 1341-1356, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2016.06.012>. Disponível em: <https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/nutrition-interventions-for-obesity>. Acesso em: 13 ago. 2020.

AYDOS, Leonardo Recena *et al.* Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 3067-3078, 16 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11123067>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/12/3067>. Acesso em: 14 fev. 2021.

BESSE-PATIN, Aurèle *et al.* An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: implications for antioxidant treatment of fatty liver disease. **International Journal Of Cell Biology**, [S.L.], v. 2014, p. 1-9, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/519153>.

BRADSHAW, Patrick T. *et al.* Metabolic syndrome in healthy obese, overweight, and normal weight individuals: the atherosclerosis risk in communities study. **Obesity**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 203-209, jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20248>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4170589/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **VIGITEL BRASIL 2019**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 137 p. Disponível em: <http://www.crn1.org.br/wp-content/uploads/2020/04/vigitel-brasil-2019-vigilancia-fatores-risco.pdf?x53725>. Acesso em: 17 jul. 2020.

BUZZETTI, Elena *et al.* The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, [S.L.], v. 65, n. 8, p. 1038-1048, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823198/>. Acesso em: 12 jan. 2020.

CAPUTO, Tiziana; GILARDI, Federica; DESVERGNE, Béatrice. From chronic overnutrition to metaflammation and insulin resistance: adipose tissue and liver contributions. **Febs Letters**, [s.l.], p.1-40, 5 jul. 2017. Wiley-Blackwell. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.12742>. Acesso em: 22 set. 2019.

CARR, Rotonya M.; AHIMA, Rexford S. Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. **Experimental Cell Research**, [s.l.], v. 340, n. 2, p.187-192, jan. 2016. Elsevier BV. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.021>. Acesso em: 19 set. 2019.

CHOI, Yea-jin *et al.* Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes. **Laboratory Investigation**, [s.l.], v. 94, n. 10, p. 1114-1125, 11 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2014.98>. Disponível em: [10.1038/labinvest.2014.98](http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2014.98). Acesso em: 13 abr. 2020.

CICHOŚ-LACH, Halina *et al.* The BARD score and the NAFLD fibrosis score in the assessment of advanced liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Medical Science Monitor**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 1-12, 2012. International Scientific Information, Inc. <http://dx.doi.org/10.12659/msm.883601>. Disponível em: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/883601>. Acesso em: 01 jan. 2020.

CLARK, Jeanne M.; BRANCATI, Frederick L.; DIEHL, Anna Mae. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. **The American Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 960-967, maio 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572->

0241.2003.07486.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12809815/>. Acesso em: 01 fev. 2021.

CYMERYS, Margaret. Buriti *Mauritia flexuosa* L.f. In: SHANLEY, Patricia. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: Cifor & Imazon, 2005. p. 181-188. Disponível em: https://www.cifor.org/publications/pdf_files/Books/BShanley0501.pdf. Acesso em: 01 jan. 2019.

D'ESPESSAILLES, Amanda *et al.* Dietary Rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oil prevents high diet-induced hepatic steatosis in mice. **Food & Function**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 3109-3116, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo00741k>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26218006/>. Acesso em: 17 nov. 2019.

DOSSI, Camila G. *et al.* Effects of rosa mosqueta oil supplementation in lipogenic markers associated with prevention of liver steatosis. **Food & Function**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 832-841, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6fo01762b>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/fo/c6fo01762b#!divAbstract>. Acesso em: 05 maio 2019.

FAN, Nengguang *et al.* Triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a surrogate for nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-9, 2 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-019-0986-7>. Disponível em: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12944-019-0986-7>. Acesso em: 01 dez. 2020.

FAO, OPAS. **Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional**. Santiago, 2017. 165 p.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba *et al.* Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 13 maio 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12053117>.

FERRAMOSCA, Alessandra *et al.* Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: new insights and updates. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 23, n. 23, p. 4146-4156, 2017. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i23.4146>.

FILHO, Aderaldo Batista Gazel e LIMA, Jorge Araújo de Sousa. **O Buritizeiro (Mauritia flexuosa L.) e seu Potencial de Utilização**. [S.l.: s.n.], 2001.

FURUKAWA, Shigetada *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 15 dez. 2004. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci21625>.

GLUCHOWSKI, Nina L. et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.343-355, 21 abr. 2017. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.32>>. Acesso em: 20 set. 2019.

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-18, 15 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28617414>>. Acesso em: 22 set. 2019.

HRUBY, Adela; HU, Frank B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.673-689, 4 dez. 2014. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>>. Acesso em: 22 set. 2019.

HU, Jiamiao; CHRISTIAN, Mark. Hormonal factors in the control of the browning of white adipose tissue. **Hormone Molecular Biology And Clinical Investigation**, [s.l.], p.1-13, 21 jan. 2017. Walter de Gruyter GmbH. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1515/hmbci-2017-0017>>. Acesso em 20 set. 2019.

IHME. **Global Health Data Exchange**. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>. Acesso em: 11 jan. 2021.

ISHIZAKA, Nobukazu et al. Association Between Serum Uric Acid, Metabolic Syndrome, and Carotid Atherosclerosis in Japanese Individuals. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 1038-1044, maio 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.0000161274.87407.26>. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.atv.0000161274.87407.26>. Acesso em: 08 abr. 2020.

ITABE, Hiroyuki *et al.* Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-9, 28 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-017-0473-y>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28454542/>. Acesso em: 02 maio 2020.

JURADO-RUIZ, Enrique *et al.* An extra virgin olive oil rich diet intervention ameliorates the nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western-type” diet

in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 1-10, 13 dez. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201600549>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201600549>. Acesso em: 05 maio 2019.

KEENAN, Tanya et al. Relation of Uric Acid to Serum Levels of High-Sensitivity C-Reactive Protein, Triglycerides, and High-Density Lipoprotein Cholesterol and to Hepatic Steatosis. **The American Journal Of Cardiology**, [s.l.], v. 110, n. 12, p. 1787-1792, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.08.012>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3766845/pdf/nihms468931.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2020.

KIM, Ju Young et al. Biochemical Predictors of Early Onset Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Young Children with Obesity. **Journal Of Korean Medical Science**, [s.l.], v. 33, n. 16, p. 1-11, 2018. Korean Academy of Medical Sciences (KAMJE). <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e122>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5897157/>. Acesso em: 09 abr. 2020.

KOLOVOU, G D *et al.* Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. **Postgraduate Medical Journal**, [S.L.], v. 81, n. 956, p. 358-366, 1 jun. 2005. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2004.025601>. Disponível em: <https://pmj.bmj.com/content/81/956/358>. Acesso em: 29 jan. 2021.

LAI, Yi-Syuan *et al.* Garlic Essential Oil Protects against Obesity-Triggered Nonalcoholic Fatty Liver Disease through Modulation of Lipid Metabolism and Oxidative Stress. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 62, n. 25, p. 5897-5906, 11 jun. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf500803c>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24857364/>. Acesso em: 05 maio 2019.

LAI, Yi-Syuan *et al.* Ginger Essential Oil Ameliorates Hepatic Injury and Lipid Accumulation in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 64, n. 10, p. 2062-2071, 3 mar. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06159>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26900108/>. Acesso em: 25 set. 2020.

LEE, Hee Jae *et al.* Dietary Black Raspberry Seed Oil Ameliorates Inflammatory Activities in db/db Mice. **Lipids**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 715-727, 10 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-016-4159-4>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27165261/>. Acesso em: 27 out. 2020.

LIBBY, Andrew E. et al. Perilipin-2 Deletion Impairs Hepatic Lipid Accumulation by Interfering with Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation and Altering the Hepatic Lipidome. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 46, p.24231-24246, 27 set. 2016. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m116.759795>>. Acesso em 19 set. 2019.

LIU, Chang-qin et al. Serum uric acid is independently and linearly associated with risk of nonalcoholic fatty liver disease in obese Chinese adults. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-10, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep38605>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep38605>. Acesso em: 13 abr. 2020.

LONGO, Michele *et al.* Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 9, p. 2358, 13 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092358>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2358>. Acesso em: 30 jul. 2020.

LORENZETI, Fábio Medici et al. **Nutrição e suplementação esportiva: aspectos metabólicos, fitoterápicos e da nutrigenômica**. São Paulo: Phorte, 2015. 392 p.

MAKRIS, Angela; FOSTER, Gary D.. Dietary Approaches to the Treatment of Obesity. **Psychiatric Clinics Of North America**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 813-827, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psc.2011.08.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22098806/>. Acesso em: 01 jan. 2020.

MASARONE, Mario *et al.* Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2018, p. 1-14, 11 jun. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9547613>.

MATSUZAWA, Yuji; FUNAHASHI, Tohru; NAKAMURA, Tadashi. The Concept of Metabolic Syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. **Journal Of Atherosclerosis And Thrombosis**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 629-639, 2011. Japan Atherosclerosis Society. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.7922>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21737960/>. Acesso em: 07 jan. 2021.

MEDEIROS, Maria C. *et al.* Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 7-13, 21 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.05.001>.

MORALES, Pablo Esteban; BUCAREY, Jose Luis; ESPINOSA, Alejandra. Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins. **Journal Of Diabetes Research**, [s.l.], v. 2017, p.1-10, 2017. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1155/2017/1789395>>. Acesso em 19 set. 2019.

MÜLLER, Michael *et al.* Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 315-322, abr. 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1047>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg1047>. Acesso em: 01 jan. 2021.

ONAL, Gizem *et al.* Lipid Droplets in Health and Disease. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-10, 29 jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28662670/>. Acesso em: 01 jan. 2020.

OUCHI, Noriyuki *et al.* Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.85-97, 21 jan. 2011. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2921>>. Acesso em 19 set. 2019.

PACIFICO, Lucia *et al.* Serum uric acid and its association with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in obese children. **European Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 160, n. 1, p. 45-52, jan. 2009. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-08-0618>. Disponível em: <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/160/1/45.xml>. Acesso em: 08 abr. 2020.

PAHLAVANI, Mandana *et al.* Adipose tissue inflammation in insulin resistance: review of mechanisms mediating anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal Of Investigative Medicine**, [S.L.], v. 65, n. 7, p. 1021-1027, 27 set. 2017. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jim-2017-000535>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7561007/>. Acesso em: 08 abr. 2021.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 21-32, mar. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>. Acesso em: 01 maio 2019.

PARK, Soyoung *et al.* Korean Pine Nut Oil Attenuated Hepatic Triacylglycerol Accumulation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Nutrients**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 59-68, 21 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8010059>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728670/>. Acesso em: 01 jul. 2019.

PERLA, Francesco *et al.* The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Children**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 46-59, 6 jun. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/children4060046>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483621/pdf/children-04-00046.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2020.

PRATT, Daniel S. *et al.* Evaluation of Abnormal Liver-Enzyme Results in Asymptomatic Patients. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 342, n. 17, p. 1266-1271, 27 abr. 2000. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200004273421707>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781624>. Acesso em: 13 abr. 2020.

REILLY, Shannon M. *et al.* Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 633-643, 11 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrendo.2017.90>. Acesso em: 06 out. 2020.

ROCHLANI, Yogita *et al.* Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic Advances In Cardiovascular Disease**, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 215-225, 22 jun. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1753944717711379>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5933580/>. Acesso em: 04 jan. 2021.

ROSSI, Fernanda Saragosa *et al.* Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 104, p.631-639, dez. 2014. Disponível em: <<https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=17&Number=104>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

SAHAGÚN, D. Ortuño *et al.* Modulation of PPAR- γ by Nutraceuticals as Complementary Treatment for Obesity-Related Disorders and Inflammatory Diseases. **Ppar Research**, [S.L.], v. 2012, p. 1-17, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/318613>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2012/318613/>. Acesso em: 05 maio 2019.

SAKLAYEN, Mohammad G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current Hypertension Reports**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 1-8, fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11906-018-0812-z>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5866840/>. Acesso em: 19 maio 2020.

SANDRI, Dayane de Oliveira *et al.* ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF BURITI PULP (*Mauritia flexuosa*)

COLLECTED IN THE CITY OF DIAMANTINO – MTS1. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 1-8, 7 ago. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017864>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452017000300904&script=sci_abstract&tIng=pt. Acesso em: 01 fev. 2020.

SANTOS, Mary de Fátima Guedes dos *et al.* QUALITY CHARACTERISTICS OF FRUITS AND OILS OF PALMS NATIVE TO THE BRAZILIAN AMAZON. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 39, n., p. 1-11, 2 mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017305>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452017000700901. Acesso em: 01 fev. 2019.

SATO, Ken *et al.* Vitamin E has a beneficial effect on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition**, [S.L.], v. 31, n. 7-8, p. 923-930, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2014.11.018>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26059365/>. Acesso em: 02 fev. 2020.

SILVA, Hellen Abreu da *et al.* Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 202-208, 19 maio 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082015ao3194>. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/eins/v13n2/pt_1679-4508-eins-S1679-45082015AO3194.pdf. Acesso em: 09 abr. 2020.

SPERANZA, P. *et al.* Improving the chemical properties of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) by enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, [S.L.], v. 69, n. 4, p. 282-293, 5 out. 2018. Editorial CSIC. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0229181>. Disponível em: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1750>. Acesso em: 05 maio 2019.

TAMUCCI, Kirstin A. *et al.* The dark side of browning. **Protein & Cell**, [s.l.], p.1-12, 4 jul. 2017. Springer Nature. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1007/s13238-017-0434-2>>. Acesso em: 19 set. 2019.

THYAGARAJAN, Baskaran; FOSTER, Michelle T. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. **Hormone Molecular Biology And Clinical Investigation**, [s.l.], p.1-13, 23 jan. 2017. Walter de Gruyter GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1515/hmbci-2017-0016>>. Acesso em 19 set. 2019.

TSUCHIDA, Takuma *et al.* Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 397-411, 10 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>.

VÁZQUEZ, Cecilia Maria Passos *et al.* Oxidized Low-Density Lipoprotein (Ox-LDL) and Triggering Receptor-Expressed Myeloid Cell (TREM-1) Levels Are Associated with Cardiometabolic Risk in Nonobese, Clinically Healthy, and Young Adults. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2019, p. 1-8, 28 fev. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/7306867>. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/7306867>. Acesso em: 16 jul. 2020.

VEGIOPOULOS, Alexandros *et al.* Adipose tissue: between the extremes. **The Embo Journal**, [S.L.], v. 36, n. 14, p. 1999-2017, 16 jun. 2017. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/emboj.201696206>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28623240/>. Acesso em: 08 fev. 2021.

VIDIGAL, Fernanda de Carvalho *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **Bmc Public Health**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-13-1198>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24350922/>. Acesso em: 05 jan. 2021.

WHO. **Fiscal policies for diet and prevention of noncommunicable diseases**: technical meeting report. Geneva: Who Library Cataloguing-in-publication Data, 2016. 35 p. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/fiscal-policies-diet-prevention/en/>. Acesso em: 07 out. 2018.

WILDMAN, Rachel P. *et al.* The Obese Without Cardiometabolic Risk Factor Clustering and the Normal Weight With Cardiometabolic Risk Factor Clustering. **Archives Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 168, n. 15, p. 1617, 11 ago. 2008. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.168.15.1617>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18695075/>. Acesso em: 16 jul. 2020.

XIAO, Mian-Li *et al.* Higher serum carotenoids associated with improvement of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a prospective study. **European Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 721-730, 29 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-018-1678-1>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29594435/>. Acesso em: 01 maio 2020.

XU, Chengfu *et al.* High Serum Uric Acid Increases the Risk for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: a prospective observational study: A Prospective Observational Study. **Plos One**, [s.l.], v. 5, n. 7, p. 1-6, 14 jul. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011578>. Disponível em: <https://sci-hub.tw/10.1371/journal.pone.0011578>. Acesso em: 13 abr. 2020.

YANG, Goowon *et al.* Krill Oil Supplementation Improves Dyslipidemia and Lowers Body Weight in Mice Fed a High-Fat Diet Through Activation of AMP-Activated Protein Kinase. **Journal Of Medicinal Food**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1120-1129, dez. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2016.3720>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27982752/>. Acesso em: 58 maio 2019.

YU, B. P. *et al.* Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 139-162, 1 jan. 1994. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295932>. Acesso em: 08 abr. 2020.

YU, Jinhui *et al.* Microalgal Oil from *Schizochytrium* sp. Prevents HFD-Induced Abdominal Fat Accumulation in Mice. **Journal Of The American College Of Nutrition**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 347-356, 26 maio 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2017.1302366>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2017.1302366>. Acesso em: 01 jan. 2021.

ZATTERALE, Federica *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 10, p. 1-15, 29 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01607>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01607/full>. Acesso em: 07 fev. 2021.

ZELBER-SAGI, Shira *et al.* Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. **Liver International**, [s.l.], v. 26, n. 7, p. 856-863, set. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01311.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16911469/>. Acesso em: 13 abr. 2020.

ZHU, Shuang *et al.* Korean pine nut oil replacement decreases intestinal lipid uptake while improves hepatic lipid metabolism in mice. **Nutrition Research And Practice**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 477-485, 2016. The Korean Nutrition Society and The Korean Society of Community Nutrition. <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2016.10.5.477>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037064/>. Acesso em: 05 maio 2020.

APÊNDICE 1. ARTIGO DE REVISÃO

AYDOS, Leonardo Recena. Doença hepática gordurosa não alcoólica: fisiopatologia, tratamento e microbiota. **Go Ahead Nutrition**. Online, p. 24-36. 01 dez. 2020.

DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

Leonardo Recena Aydos

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA¹) é um termo abrangente que engloba um espectro de condições que acometem o fígado. O estágio inicial é denominado esteatose hepática e é estabelecido quando há acúmulo de gordura em área igual ou superior a 5% da área total do fígado, sem a presença concomitante de doenças que acometam o órgão, utilização de medicações esteatogênicas ou a utilização crônica de álcool [1].

Com a progressão da doença pode ocorrer um quadro conhecido como esteatohepatite não alcoólica (NASH²) onde, além do acúmulo de gordura, há também inflamação e lesão aos hepatócitos [2]. Quando não tratada, essa condição pode evoluir para fibrose hepática, quadro em que as células hepáticas começam a produzir matriz extracelular fibrótica, ou seja, o tecido começa a cicatrizar, levando ao início da perda de função do órgão. Vale destacar que esse quadro ainda é parcialmente reversível [2].

Com avanço da cicatrização do órgão instala-se o quadro de cirrose hepática. Neste estágio, a fibrose está pronunciada levando a formação de nódulos hepáticos, com alteração da função lobular do órgão, quadro que é pouco reversível [2].

O último estágio é o carcinoma hepático, em que o único tratamento pode ser o transplante hepático [3].

¹ Em inglês a doença é denominada nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)

² A esteatohepatite é comumente referida por sua sigla em inglês – NASH – de non-alcoholic steatohepatitis

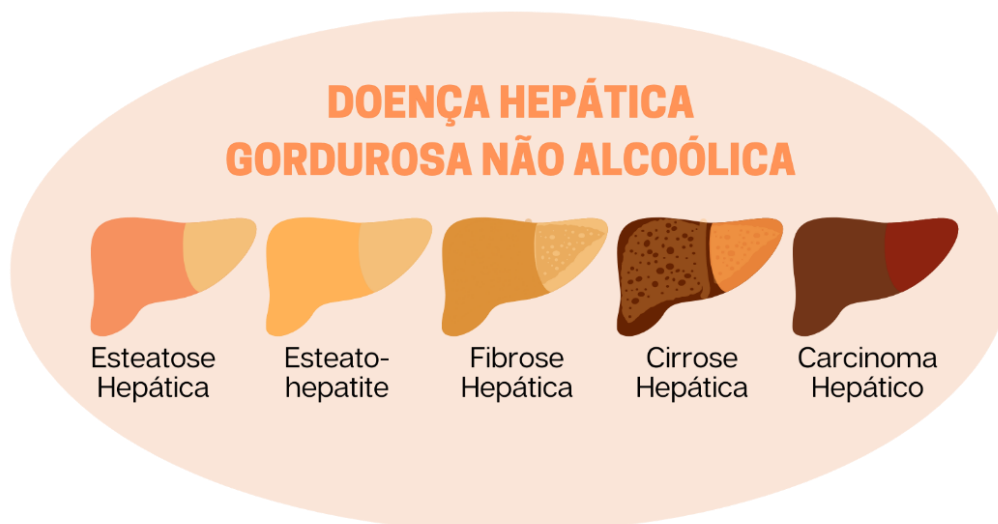


Figura 1. O espectro da doença gordurosa hepática não alcoólica (DHGNA)
Fonte: Elaboração própria

Doenças correlacionadas a doença hepática gordurosa não alcoólica

Muitas vezes, os profissionais da saúde alertam somente para o aumento na chance de desenvolvimento de carcinoma hepático. Entretanto, diversas comorbidades estão correlacionadas com a DHGNA e podem diminuir a qualidade de vida dos pacientes.

A presença de DHGNA em pacientes com diabetes está associada a um risco duas vezes maior de morte, além de aumentar a chance de complicações macro e microvasculares. A DHGNA também está correlacionada a maior risco de eventos cardiovasculares, de frequência de esclerose valvar aórtica e de fibrilação atrial [4].

Também é acentuada a incidência de problemas renais. Em uma coorte, após 3 anos de acompanhamento, foi constatado que pacientes com DHGNA, não-diabéticos e não-hipertensos tiveram 60% maior incidência de desenvolvimento de doença renal crônica [5].

Além disso, já foram associados à doença um aumento na severidade de apneia obstrutiva do sono, um aumento de 2,5 vezes na chance de fraturas osteoporóticas, duas vezes o risco do desenvolvimento de pedras nos rins e, possivelmente, pode contribuir para o desenvolvimento de disfunção erétil [4].

Ainda, constata-se correlação com: psoríase, periodontite, hipotireoidismo, endocrinopatias e síndrome do ovário policístico [4].

Diagnóstico da doença hepática gordurosa não alcoólica

O método padrão-ouro para diagnóstico da DHGNA é a biópsia de fígado. Mas, esse método possui a desvantagem de ser invasivo e potencialmente perigoso. Além disso, devido ao fato de a biópsia cobrir somente uma área de 1/50.000 do órgão, e as lesões não serem uniformemente distribuídas, pode não representar com exatidão a realidade da doença [6].

Na prática clínica, o método com melhor custo-benefício para diagnosticar a doença é a ultrassonografia de fígado, que possui sensibilidade de 85% e especificidade de 94% [7]. A desvantagem é que esse método não consegue indicar o grau de lesão hepática.

Outra opção prática e viável é por meio de exames de sangue associados a utilização de estimativas como o *NAFLD fibrosis score*, o *FIB-4 score* ou o *BARD score* [8,9]. Todos estes possuem calculadoras *online*, que os profissionais da saúde podem utilizar para facilitar os cálculos.

Fisiopatologia e tratamento

É fundamental que o profissional da saúde compreenda os fatores que levam ao estabelecimento da DHGNA, já que ela não ocorre por um único mecanismo, mas, sim, é uma doença de etiologia multifatorial (Figura 2). Ou seja, cada paciente pode ter determinada via contribuindo de forma mais significativa para progressão da doença. Por isso, o tratamento é individualizado e cabe ao profissional decidir quais pontos devem receber maior atenção.

Embora pacientes que não estão com sobrepeso possam ter DHGNA, o principal fator que contribui para doença é o excesso de peso, sendo que a doença pode estar presente em até 98% dos indivíduos obesos não-diabéticos [10].

O estilo de vida, geralmente marcado pela supernutrição – principalmente com um padrão alimentar caracterizado pelo excesso de gordura saturada, glicose e frutose advindas de bebidas e alimentos com esses carboidratos adicionados – além do sedentarismo, fatores ambientais e genéticos, são componentes que estão associados a resistência à insulina, obesidade e alterações na microbiota intestinal, e podem levar ao desenvolvimento da DGHNA (**Figura 2**).

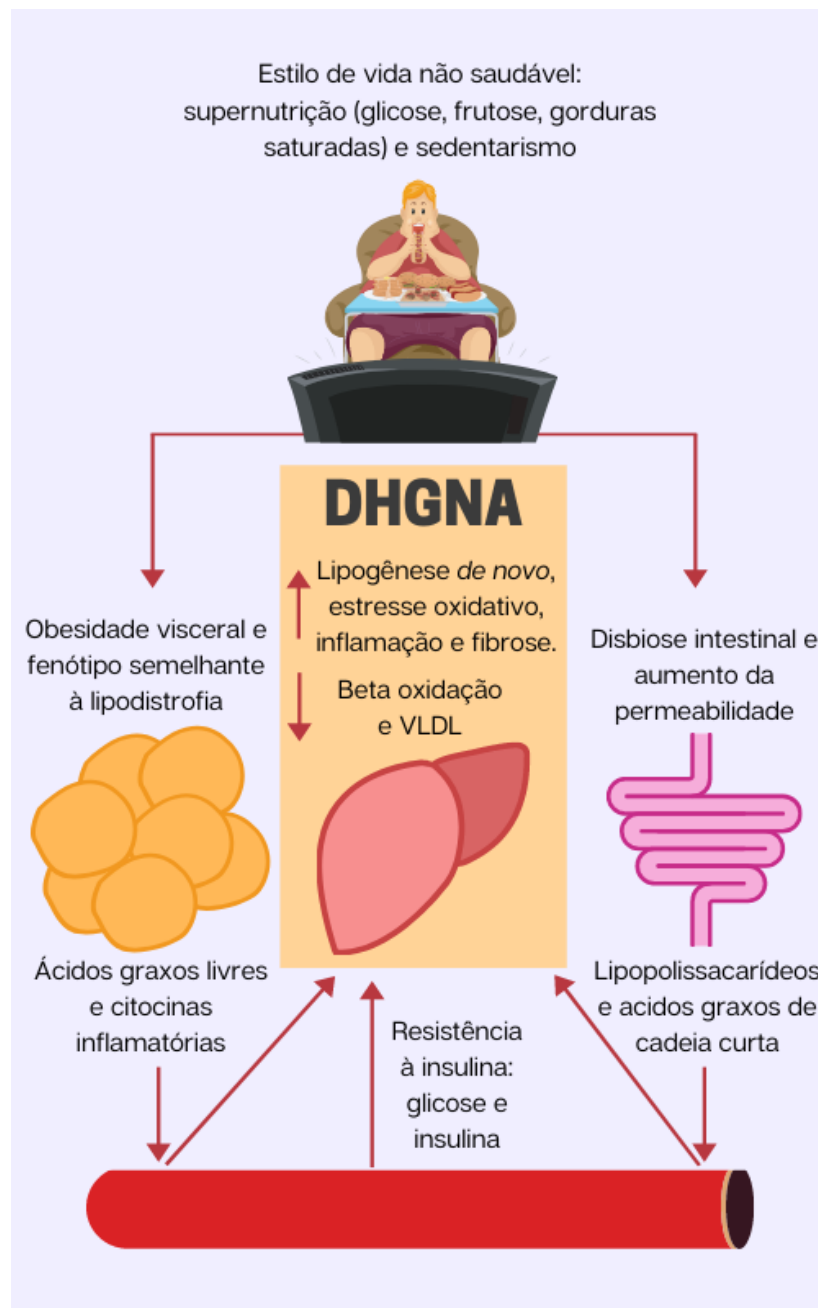


Figura 2. Fisiopatologia da Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)
Fonte: Elaboração própria

Explicar a gênese e progressão da DHGNA é um processo complexo. Por isso, a fisiopatologia aqui descrita aborda os principais fatores que levam ao estabelecimento e progressão da doença, mas não engloba todos possíveis pontos elencados na literatura científica, principalmente com relação as diferentes alterações moleculares relacionadas a cada processo.

O objetivo é apresentar ao leitor um panorama dos mecanismos envolvidos na DHGNA e, se necessário, posteriormente procurar literaturas específicas para expandir seu conhecimento sobre cada tema.

Disfunção do tecido adiposo

Inicialmente o tecido adiposo pode aumentar sua capacidade de acumular gordura realizando uma expansão saudável, na qual os pré-adipócitos se tonam adipócitos maduros. Esse quadro é caracterizado pela hiperplasia do tecido (maior número de adipócitos), sem aumento exacerbado no volume das células, com a manutenção da sensibilidade à insulina e a ausência de inflamação [11].

Entretanto, o acúmulo de gordura na DHGNA é geralmente marcado por um padrão de expansão do tecido adiposo não saudável. Isto ocorre quando, após um superávit calórico contínuo, o tecido adiposo atinge um limite de expansão saudável. Assim, para conseguir armazenar a gordura, os adipócitos se hipertrofiam. Esse aumento das células acaba causando a oclusão dos vasos sanguíneos que levam nutrientes e oxigênio as células do tecido, ocasionando a morte por hipóxia de adipócitos. Com a morte de células, macrófagos são recrutados para o tecido e, devido a limitação de espaço, acabam ficando presos. Assim, se torna necessário o recrutamento de mais macrófagos para fagocitarem o tecido danificado [12,13].

Tanto o estresse mecânico gerado pelo tecido hipertrofiado, quanto o recrutamento de macrófagos, a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMP) – liberados após a morte de adipócitos –, os ácidos graxos livres que chegam em excesso ao tecido e os lipopolissacarídeos (LPS) advindos da microbiota intestinal, vão contribuir para o aumento da expressão de moléculas como a proteína-1 quimioatraente de monócito (MCP-1) e citocinas pró-inflamatórias. Caracterizando a inflamação do tecido adiposo [11,13,14].

Tecido hepático

As citocinas pro-inflamatórias do tecido adiposo vão para corrente sanguínea e chegam ao fígado. Ao receberem essas moléculas os hepatócitos respondem aumentando a atividade do factor nuclear kappa (NF-κB). Este fator de transcrição irá se deslocar para o núcleo celular e aumentar a expressão de citocinas inflamatórias,

como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6). Portanto, a inflamação presente nesse momento, embora seja de baixo grau, é crônica e sistêmica, quadro que está diretamente correlacionado com a resistência à insulina [15–17].

A resistência à insulina contribuiu de forma importante para o acúmulo de gordura hepática. Com o funcionamento inadequado desse hormônio, os adipócitos não recebem corretamente a informação de que o indivíduo está em um estado alimentado. Motivo pelo qual alguns autores afirmam que obesidade é marcada por um constante estado de jejum. Assim, os adipócitos aumentam a lipólise ocasionando um efluxo contínuo de ácidos graxos livres para corrente sanguínea.

Além disso, com a resistência à insulina, também está presente maior quantidade de glicose e insulina na corrente sanguínea. Essas substâncias sinalizam fatores de transcrição como o fator de transcrição 1-C de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1C) que, ao ser estimulado pela insulina, aumenta a expressão de enzimas lipogênicas, como a ácido graxo sintase (FAS) e a acetil-CoA carboxilase (ACC). Assim, ocorre um estímulo a lipogênese *de novo* (síntese de lipídeo a partir de glicose).

Já a glicose, além de servir como substrato, irá aumentar a expressão e atividade da proteína de ligação ao elemento de resposta sensível a carboidratos (ChREBP), que também contribui para lipogênese pela regulação de enzimas como a FAS e a ACC.

Portanto, os ácidos graxos derivados do tecido adiposo, os produzidos no fígado pela lipogênese *de novo*, além dos substratos decorrentes da microbiota intestinal (que são explicados posteriormente), podem ser empacotados em triglicerídeos, contribuindo para o acúmulo de gordura hepática.

O excesso de ácidos graxos nos hepatócitos acaba saturando a capacidade de exportar o excedente via VLDL, bem como a realização de β -oxidação. Por isso, a doença é marcada pela lipotoxicidade, fator que aumenta a inflamação e o estresse oxidativo e leva a maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no fígado, contribuindo para progressão da doença.

Microbiota intestinal e doença hepática gordurosa não alcoólica

Vários experimentos em camundongos já demonstraram que alterações na microbiota intestinal podem acarretar o surgimento de DHGNA. Entretanto, é preciso cuidado ao extrapolar os resultados desses achados, já que a composição da microbiota de seres humanos difere substancialmente da dos camundongos, além da diferente arquitetura do trato digestivo [6].

Por mais que alguns modelos animais utilizem métodos de indução da DHGNA que são completamente diferentes da gênese da doença em humanos, como a DHGNA induzida pelo modelo de camundongos deficientes em colina, outros se aproximam mais da realidade como a DHGNA induzida por dieta hiperlipídica. Também já foi demonstrado que o transplante de microbiota fecal de mulheres com DHGNA para camundongos com dieta padrão, foi capaz de aumentar os triglicerídeos hepáticos após 14 dias [6]. Portanto, apesar das limitações, os modelos animais nos indicam que, de fato, a microbiota intestinal exerce influência no surgimento e progressão da DHGNA [6].

Diversos mecanismos podem ligar a microbiota com a DHGNA. O aumento da permeabilidade intestinal e a consequente passagem de LPS derivados das bactérias intestinais para corrente sanguínea é um destes. Os LPS derivados da microbiota podem contribuir para inflamação do tecido adiposo e também, ao serem interceptados por receptores do tipo *toll 4* (TLR4) nas células estreladas hepáticas, podem induzir a produção de matriz extracelular fibrótica, ou seja, contribuir para fibrose do órgão [6].

Outro mecanismo é a produção de etanol pelas bactérias intestinais. Estudos já demonstraram que alguns pacientes com DHGNA apresentavam maiores concentrações de etanol na respiração, mesmo sem a ingestão de álcool [18].

Muito se fala sobre a influência das fibras fermentáveis na microbiota intestinal. Ao serem fermentadas, elas podem gerar ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como butirato, acetato e propionato, mecanismo que muitas vezes pensamos ser unicamente benéfico. Mas, a máxima de que fibras são benéficas para microbiota intestinal pode não ser sempre válida para pacientes com DHGNA.

Estudos animais já demonstraram que os AGCC produzidos pela microbiota intestinal a partir de fibras são uma via de mão dupla. De um lado maiores concentrações de AGCC ao ativarem o receptor 43 acoplado à proteína G (GPR43)

podem estimular uma resposta anti-inflamatória. De outro, os AGCC podem servir de substrato para maior produção de triglicérides intra-hepáticos [6].

Um exemplo dessa complexidade foi uma pesquisa de 2018, publicada no periódico *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Nesse estudo com seres humanos, o grupo tratamento recebeu 20 gramas de éster de inulina-propionato, uma substância com objetivo de aumentar a quantidade de propionato no cólon, já o grupo controle recebeu 20 gramas de inulina. Ao final de 42 dias, enquanto o grupo tratamento não apresentou diferença na quantidade de lipídeos intra-hepáticos, o grupo que recebeu inulina teve um aumento de 20,9% para 26,8%. Segundo os autores, a explicação para esse maior acúmulo de gordura hepática se deve ao fato de que a microbiota produz principalmente acetato após a fermentação da inulina e, em um contexto de DHGNA, ele pode servir como substrato para produção e consequente armazenamento de lipídeos no fígado [19].

Em contrapartida, em 2019 um estudo publicado no *European Journal of Nutrition* demonstrou que a suplementação de oligofrutose (8 g/dia por 12 semanas seguido de 16 g/dia por 24 semanas), foi capaz de reduzir o *score* de gordura hepática aferido por biópsia hepática, independente da perda de peso ou alterações no estilo de vida. A suplementação ocasionou alterações possivelmente benéficas na microbiota dos indivíduos ao aumentar a quantidade de bifidobactérias e reduzir as bactérias do *cluster* Clostridium [20].

Portanto, embora pesquisas demonstrem que os frutanos, do tipo inulina, potencialmente possam melhorar o sistema digestivo, a síndrome metabólica, o sistema imunológico, doenças inflamatórias e prevenir contra infecções e câncer, quando se trata do tratamento da DHGNA, ainda são necessários mais ensaios clínicos [21]. No momento, devemos nos atentar às doses e à individualidade com que cada paciente irá responder ao tratamento.

Tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica

De acordo com a fisiopatologia da doença, fica claro que o tratamento deve considerar fatores como: melhoria do padrão alimentar, redução de gordura corporal, modulação da microbiota intestinal, além da utilização de alimentos e suplementos com potencial anti-inflamatório e/ou antioxidante.

Conforme apresentado na **Figura 2**, um dos principais fatores para o tratamento da DHGNA é a redução de peso. Uma perda de 7 a 10% de peso total é capaz de reverter a presença de DHGNA em 50% dos indivíduos com IMC ≥ 25 kg/m² e em 75% dos indivíduos com IMC < 25 kg/m².

Entretanto, o tratamento não se resume ao emagrecimento, uma prova disso é a etiologia multifatorial da doença, o fato de que pessoas com IMC classificado como eutrófico também poderem apresentar DHGNA, e o fato de ensaios clínicos terem demonstrado reversão no acúmulo de gordura hepática com dietas isocalóricas, que não promoveram perda de peso ou gordura corporal.

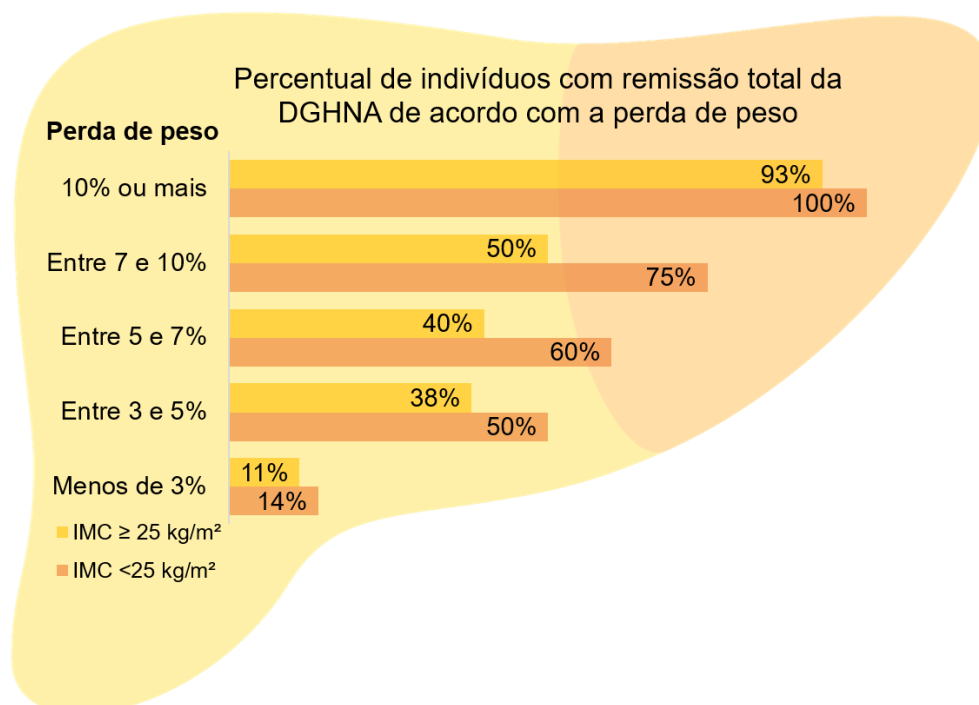


Figura 3. Percentual de indivíduos com remissão da DHGNA de acordo com o percentual de peso perdido.

Fonte: Adaptado de Wong et al. (2018) [22]

Conforme resumido no **Quadro 1**, diferentes dietas apresentam potencial para redução da DHGNA. Portanto, não podemos dizer que exista uma distribuição de macronutrientes superior para o tratamento da doença. Além disso, a adesão ao tratamento é um componente determinante e depende de fatores inerentes a cada indivíduo.

Quadro 1. Dietas no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica

Fonte: Adaptado de Moore et al. (2020) [23]

Tipo de dieta	CHO (%)	PTN (%)	LIP (%)	Desfecho com relação ao tratamento da DHGNA
Low-carb	≤40	20-30	≥25	A redução de carboidratos por curtos períodos se mostrou efetiva na redução da gordura intra-hepática. No longo prazo apresenta redução da gordura hepática estatisticamente igual a dieta <i>low-fat</i> . A redução na gordura hepática pode ser unicamente devida ao balanço energético negativo.
Cetogênica	≤5	10-15	>70-90	Reduz a gordura hepática em ensaios de curto tempo. Ainda são necessários estudos de longo prazo.
Hiperproteica	≤45	~40	20-25	Pode conferir benefícios metabólicos e reduzir a gordura hepática no curto prazo, independente do peso. Uma dieta rica em determinados aminoácidos por estimular a lipogênese <i>de novo</i> .
Mediterrâneo	50	15	30	Apresentou resultados favoráveis em ensaios de curto prazo. Ainda são necessários estudos de longo prazo com análises histopatológicas.
Paleolítica	35-45	20-30	30	Possui evidência de benefícios em razão da perda de peso. Ainda são necessários estudos de longo prazo específicos com relação a pacientes com DHGNA.
Plant-based	50-70	15-20	10-25	Evidência de promover redução no peso e prevenir contra a DHGNA. Ainda são necessários estudos específicos com relação aos desfechos hepáticos.

Embora a ciência demonstre que não há uma dieta mais indicada, o padrão alimentar de dieta do mediterrâneo é um dos mais estudados e tem se mostrado efetivo na redução da DHGNA em ensaios clínicos. Por esse motivo, algumas diretrizes como a da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL) e da Associação Italiana para o Estudo do Fígado (AISF) consideram a dieta do mediterrâneo como padrão ouro para o tratamento da doença [24].

Em um estudo cruzado, publicado no *World Journal of Gastroenterology*, em 2019, os autores demonstraram que uma dieta do padrão mediterrâneo composta por 40% de carboidratos, 40% de gordura (sendo <10% de gordura saturada) e 20% de proteína foi capaz de reduzir o peso, a gordura visceral e a ALT de indivíduos com DHGNA. Sendo que, após 16 semanas de intervenção, foi constatada uma redução

de 35,15% nos níveis séricos de ALT, após uma redução de 5,80% de peso. Outro fator importante foi que essa redução foi mantida após 16 semanas de *wash-out* da dieta. Entretanto, o tratamento não demonstrou melhora na permeabilidade intestinal [25].

Porém, devemos levar em conta que estabelecer um novo padrão alimentar pode ser uma opção que não se adapta a realidade do paciente. Dessa forma, uma alternativa seria associar a dieta que melhor se adapte à realidade individual com alguns alimentos que possuem potencial de contribuir para remissão da doença e/ou da melhora em parâmetros metabólicos. Para isso, podemos associar a perda de peso à melhora no microbiota intestinal, redução na inflamação e atenuação do estresse oxidativo.

Um exemplo de alimento com esse potencial é o azeite de oliva. Em um ensaio duplo-cego randomizado, pacientes com DHGNA foram instruídos a realizar uma dieta hipocalórica com redução de -500 kcal diárias e uma suplementação de 20g/dia de azeite de oliva ou óleo de girassol, por 12 semanas. Ao final do experimento, os dois grupos apresentaram redução no *score* de gordura no fígado, peso, circunferência da cintura e pressão arterial. Mas, enquanto o grupo que recebeu óleo de girassol teve uma redução média de 17% no *score* de gordura no fígado, o grupo que ingeriu azeite de oliva apresentou cerca de 42% de redução.

Em outro ensaio clínico, pacientes seguiram uma dieta isocalórica composta por 28% de gorduras monoinsaturadas, sendo que destas, 50% eram provenientes de azeite de oliva. Após 12 semanas o grupo que recebeu azeite de oliva apresentou redução de 18% na fração de gordura no fígado, aferida por espectroscopia de ressonância magnética, mesmo sem alterações no peso [26].

Outra opção que pode contribuir para melhora da DHGNA é a suplementação de vitamina E. Em uma meta-análise publicada em 2016 na revista *Medicine*, a vitamina E demonstrou nível de evidência alto para melhora da NASH, da esteatose hepática, do *score* de gordura no fígado e do balonismo hepatocelular [27]. Duas meta-análises de 2020 corroboram com esses achados e concluem que a vitamina E é uma opção de tratamento para pacientes adultos com DHGNA, especialmente para aqueles com NASH [28,29]. Os estudos geralmente utilizam doses de cerca de 800 UI/dia, já o tempo de tratamento varia de 3 meses a até 4 anos.

Vale destacar que, os resultados com relação a fibrose hepática ainda são incertos ou inexistentes [29]. A suplementação de vitamina E não demonstrou

benefício em crianças com DHGNA [30]. Outro fato a se ponderar foi que um estudo, publicado na *PLOS ONE*, elencou a hipótese de que a vitamina E pode não ser uma alternativa viável como tratamento preventivo contra o surgimento da DHGNA, ou seja, seu uso poderia ser prejudicial se feito antes do estabelecimento da doença, mas, no momento, isso é apenas uma hipótese [31].

Apesar das ressalvas feitas anteriormente com relação aos prebióticos no tratamento da DHGNA, o saldo para eles ainda é positivo. Uma meta-análise de 2018 publicada na *Nutrition Reviews* demonstrou efeitos favoráveis na redução da AST, ALT, GGT, triglicerídeos e IMC. Mas não foi encontrada diferença estatística para os níveis de proteína C-reativa (PCR) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [32]. Os estudos clínicos randomizados controlados utilizados nessa meta-análise incluíam o efeito dos prebióticos: fibra de *Cassia tora*, frutoligossacarídeos, *Psyllium husk*, xilooligossacarídeos, cereais contendo beta-glucana e inulina de chicória enriquecida com oligofrutose [32].

Com relação aos probióticos e simbióticos, uma meta-análise publicada em 2019 no *The American Journal of Clinical Nutrition* demonstrou que a terapia com probióticos ou simbióticos foi capaz de reduzir a esteatose hepática aferida por ultrassonografia, além de reduzir os níveis séricos de ALT [33]. Corroborando com esses resultados, uma meta-análise também de 2019 publicada no *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* mostrou reduções estatisticamente significativas nos níveis das enzimas hepáticas e de PCR. Com relação ao TNF- α , somente o grupo dos simbióticos apresentou redução significativa [34].

As cepas probióticas mais comumente utilizadas nos estudos que administraram probióticos foram: *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum*. Já os estudos com simbióticos utilizaram em sua maioria estas mesmas cepas, porém, com a adição de frutooligossacarídeos [34].

Além desses exemplos, diversos compostos isolados como a curcumina, o resveretrol e a quercetina, e produtos naturais como iogurte, farinha de linhaça marrom, uvas, chá verde, suco de laranja, hibisco, *Aloe vera*, Wild bitter melon, berberina e alguns ácidos graxos poli-insaturados também podem ser utilizados como adjuvantes ao tratamento [35–37].

Vale ressaltar que não existe nenhum medicamento aprovado pela FDA ou ANVISA para controle da DHGNA. A indicação é, exclusivamente, a mudança no estilo

de vida. Nesse sentido, uma abordagem integrativa da nutrição é o fator chave em um tratamento bem sucedido.

Referências

1. Recena Aydos L, Aparecida do Amaral L, Serafim de Souza R, Jacobowski AC, Freitas dos Santos E, Rodrigues Macedo ML. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. **Nutrients**. 2019;11: 3067. doi:10.3390/nu11123067
2. Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Arch Toxicol**. 2017;91: 1545–1563. doi:10.1007/s00204-016-1892-7
3. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. **Nature Medicine**. 2018. doi:10.1038/s41591-018-0104-9
4. Rosato V, Masarone M, Dallio M, Federico A, Aglitti A, Persico M. NAFLD and Extra-Hepatic Comorbidities: Current Evidence on a Multi-Organ Metabolic Syndrome. **Int J Environ Res Public Health**. 2019;16: 3415. doi:10.3390/ijerph16183415
5. Chang Y, Ryu S, Sung E, Woo H-Y, Oh E, Cha K, et al. Nonalcoholic fatty liver disease predicts chronic kidney disease in nonhypertensive and nondiabetic Korean men. **Metabolism**. 2008;57: 569–576. doi:10.1016/j.metabol.2007.11.022
6. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2020;17: 279–297. doi:10.1038/s41575-020-0269-9
7. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, Kamel I, Brancati FL, Guallar E, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: A meta-analysis. **Hepatology**. 2011;54: 1082–1090. doi:10.1002/hep.24452
8. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. **Hepatology**. 2007;45: 846–854. doi:10.1002/hep.21496
9. Cichoz-Lach H, Celiński K, Prozorow-Król B, Swatek J, Słomka M, Lach T. The

- BARD score and the NAFLD fibrosis score in the assessment of advanced liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Med Sci Monit.** 2012;18: 735–740. doi:10.12659/MSM.883601
10. Spradley FT, Smith JA, Alexander BT, Anderson CD. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease as a risk factor for exaggerated metabolic and cardiovascular-renal disease. **Am J Physiol Metab.** 2018;315: E795–E814. doi:10.1152/ajpendo.00394.2017
 11. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol.** 2017;13: 633–643. doi:10.1038/nrendo.2017.90
 12. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. **J Cell Biol.** 2015;208: 501–12. doi:10.1083/jcb.201409063
 13. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **Eur J Clin Invest.** 2018;48: e12997. doi:10.1111/eci.12997
 14. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 85–97. doi:10.1038/nri2921
 15. Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Exp Gastroenterol.** 2014;7: 221–239. doi:10.2147/CEG.S62831
 16. Abenavoli L, Milic N, Di Renzo L, Preveden T, Medic-Stojanoska M, De Lorenzo A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.** 2016;22: 7006–7016. doi:10.3748/wjg.v22.i31.7006
 17. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism.** 2016; 65: 1038–1048. doi:10.1016/j.metabol.2015.12.012
 18. Volynets V, Ku MA, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, Ko A. Nutrition , Intestinal Permeability , and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic **Fatty Liver Disease** (NAFLD). 2012; 1932–1941. doi:10.1007/s10620-012-2112-9
 19. Chambers ES, Byrne CS, Ruyendo A, Morrison DJ, Preston T, Tedford C, et al. The effects of dietary supplementation with inulin and inulin-propionate ester on hepatic steatosis in adults with non-alcoholic fatty liver disease. (?????????nome da revista)2019; 372–376. doi:10.1111/dom.13500
 20. Bomhof MR, Parnell JA, Ramay HR, Crotty P, Rioux KP, Probert CS, et al.

- Histological improvement of non-alcoholic steatohepatitis with a prebiotic : a pilot clinical trial. **Eur J Nutr.** 2018;0: 0. doi:10.1007/s00394-018-1721-2
21. Man S, Liu T, Yao Y, Lu Y, Ma L, Lu F. Friend or foe? The roles of inulin-type fructans. **Carbohydr Polym.** 2021;252: 117155. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117155
 22. Wong VW-S, Wong GL-H, Chan RS-M, Shu SS-T, Cheung BH-K, Li LS, et al. Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol.** 2018;69: 1349–1356. doi:10.1016/j.jhep.2018.08.011
 23. Moore MP, Cunningham RP, Dashek RJ, Mucinski JM, Rector RS. A Fad too Far? Dietary Strategies for the Prevention and Treatment of NAFLD. **Obesity.** 2020;28: 1843–1852. doi:10.1002/oby.22964
 24. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. **World J Gastroenterol.** 2018;24: 3361–3373. doi:10.3748/wjg.v24.i30.3361
 25. Biolato M, Manca F, Marrone G, Cefalo C, Racco S, Miggiano GA, et al. Intestinal permeability after Mediterranean diet and low-fat diet in non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.** 2019;25: 509–520. doi:10.3748/wjg.v25.i4.509
 26. Errazuriz I, Dube S, Slama M, Visentin R, Nayar S, O'Connor H, et al. Randomized Controlled Trial of a MUFA or Fiber-Rich Diet on Hepatic Fat in Prediabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** 2017;102: 1765–1774. doi:10.1210/jc.2016-3722
 27. Sawangjit R, Chongmelaxme B, Phisalprapa P, Saokaew S, Thakkinstian A, Kowdley K V., et al. Comparative efficacy of interventions on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Medicine (Baltimore).** 2016;95: e4529. doi:10.1097/MD.0000000000004529
 28. Vadarlis A, Antza C, Bakaloudi DR, Doundoulakis I, Kalopitas G, Samara M, et al. Systematic review with meta-analysis: The effect of vitamin E supplementation in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol Hepatol.** 2020; jgh.15221. doi:10.1111/jgh.15221
 29. Usman M, Bakhtawar N. Vitamin E as an Adjuvant Treatment for Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Cureus.** 2020;12. doi:10.7759/cureus.9018



30. Amanullah I, Khan YH, Anwar I, Gulzar A, Mallhi TH, Raja AA. Effect of vitamin E in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Postgrad Med J**. 2019;95: 601–611. doi:10.1136/postgradmedj-2018-136364
31. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Ramos MP, Viana M. Short-term vitamin E treatment impairs reactive oxygen species signaling required for adipose tissue expansion, resulting in fatty liver and insulin resistance in obese mice. Peterson JM, editor. **PLoS One**. 2017;12: e0186579. doi:10.1371/journal.pone.0186579
32. Loman BR, Hernández-Saavedra D, An R, Rector RS. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2018;76: 822–839. doi:10.1093/nutrit/nuy031
33. Sharpton SR, Maraj B, Harding-Theobald E, Vittinghoff E, Terrault NA. Gut microbiome-targeted therapies in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Am J Clin Nutr**. 2019;110: 139–149. doi:10.1093/ajcn/nqz042
34. Khan MY, Mihali AB, Rawala MS, Aslam A, Siddiqui WJ. The promising role of probiotic and synbiotic therapy in aminotransferase levels and inflammatory markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease - A systematic review and meta-analysis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**. 2019;31: 703–715. doi:10.1097/MEG.0000000000001371
35. Silva Figueiredo P, Inada A, Ribeiro Fernandes M, Granja Arakaki D, Freitas K, Avellaneda Guimarães R, et al. An Overview of Novel Dietary Supplements and Food Ingredients in Patients with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Molecules**. 2018;23: 877. doi:10.3390/molecules23040877
36. Yari Z, Rahimlou M, Eslamparast T, Ebrahimi-Daryani N, Poustchi H, Hekmatdoost A. Flaxseed supplementation in non-alcoholic fatty liver disease: A pilot randomized, open labeled, controlled study. **Int J Food Sci Nutr**. 2016;67: 461–469. doi:10.3109/09637486.2016.1161011
37. Chen Y, Feng R, Yang X, Dai J, Huang M, Ji X, et al. Yogurt improves insulin resistance and liver fat in obese women with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**. 2019;109: 1611–1619. doi:10.1093/ajcn/nqy358

APÊNDICE 2. ARTIGO DE REVISÃO

AYDOS, Leonardo Recena; AMARAL, Luane Aparecida do; SOUZA, Roberta Serafim de; JACOBOWSKI, Ana Cristina; SANTOS, Elisvânia Freitas dos; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. **Nutrients**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 3067-3079, 16 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11123067>.

Review

Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models

Leonardo Recena Aydos ^{1,2,*} , Luane Aparecida do Amaral ¹, Roberta Serafim de Souza ^{1,2}, Ana Cristina Jacobowski ², Elisvânia Freitas dos Santos ^{1,3} and Maria Lígia Rodrigues Macedo ^{1,2,3} 

¹ Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Medical School, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; luapamaral@hotmail.com (L.A.d.A.); robertaserafim06@gmail.com (R.S.d.S.); elisvania@gmail.com (E.F.d.S.); ligiamacedo18@gmail.com (M.L.R.M.)

² Protein Purification Laboratory and its Biological Functions (LPPFB) of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil; anacristinaj@gmail.com

³ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food, and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, Brazil

* Correspondence: leonardoaydos@gmail.com; Tel.: +55-67-999861502

Received: 26 November 2019; Accepted: 12 December 2019; Published: 16 December 2019



Abstract: Researchers have a range of animal models in which to study Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Induction of NAFLD by a high-fat diet in the C57BL/6 strain is the most widely used among mice. In this study, we review works that performed NAFLD induction by a high-fat diet using the C57BL/6 strain, focusing on experiments on the effects of lipid ingestion. Studies are initially distinguished into researches in which mice received lipids by oral gavage and studies in which lipid was added to the diet, and each of these designs has peculiarities that must be considered. Oral gavage can be stressful for animals and needs trained handlers but allows accurate control of the dose administered. The addition of oils to the diet can prevent stress caused to mice by gavage, but possible changes in the consistency, taste, and smell of the diet should be considered. Regarding the experimental design, some variables, such as animal sex, treatment time, and diet-related variables, appear to have a definite pattern. However, no pattern was found regarding the number of animals per group, age at the beginning of the experiment, time of adaptation, the substance used as a vehicle, and substance used as a control.

Keywords: nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD; C57BL mice; obesity; high-fat diet

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the presence of hepatic steatosis at a level greater than or equal to 5% of the liver area without the presence of other diseases that affect the organ or the use of alcohol in quantities considered harmful [1]. The spectrum of the disease ranges from simple liver fat accumulation—so-called hepatic steatosis—to more severe progressions such as nonalcoholic steatohepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma.

It is estimated that 25% of the world's population has NAFLD [2]. In South America, this number reaches 30.45% [1]. Because some patients do not show changes in blood tests, the prevalence of the disease may be even higher [3].

The etiology of the disease is multifactorial, and its onset and progression depend on factors related to diet, weight, gut microbiota, in addition to the contribution of genetic factors [4–6]. The presence of the disease is correlated with obesity and is present in up to 91% of severely obese patients (Body mass index—BMI > 35 kg/m²) [7].

Obesity can reduce quality of life and is associated with unemployment and low productivity. According to the Global Health Observatory data repository, 39% of the world's population over 18 were overweight (BMI \geq 25), and 13.1% were obese (BMI \geq 30) in 2016. Between 1996 and 2016, the number of obese people increased by 65.82% [8]. The situation is worsening in Latin America and the Caribbean, where about 58% of the population, i.e., 360 million people, are overweight, and the number of obese people reaches 23%, totaling 140 million people [9].

As no drug therapy for NAFLD treatment has been approved by the US Food and Drug Administration to date, researchers have been studying functional foods that can alleviate the disease [10]. Among them, lipids can contribute significantly to homeostasis recovery. Fatty acids, besides providing energy to the body, are precursors of signaling molecules and hormones and play an important role in gene regulation. When ingested, they can bind to specific receptors that change the functioning of nuclear transcription factors, and alter the expression of several genes depending on the composition of dietary lipids [11].

Researchers now have a range of animal models to research the effects of lipids on NAFLD. C57BL/6 mice, Wistar, and Sprague Dawley rats are generally the most used because of their intrinsic predilection for the development of obesity, type 2 diabetes mellitus, and NAFLD. NAFLD can be experimentally induced by animals with genetic changes (combined or not with hypercaloric diets), such as in leptin-deficient (OB/OB) mice models, which have an alteration in the gene responsible for leptin production, and leptin receptor deficient (DB/DB) mice, which have a mutation in the receptor coding gene for this same hormone [12].

There are models described as “chemical models”, in which the disease is caused by the administration of drugs such as streptozotocin or carbon tetrachloride. In addition to these, there are others that only involve dietary changes, such as a methionine and choline-deficient diet, a high fructose diet, and a high-fat diet [13–15].

Each model has its own characteristics and should be adopted according to the research objective. To help in this choice, there are several review studies in the literature that may help researchers [15–18].

In this study, we focus on NAFLD induction by a high-fat diet in C57BL/6 strain mice, which is the most commonly used strain for this experimental disease model [18]. High-fat diet intake allows animals to develop obesity, hyperinsulinemia, hyperglycemia, hypertension, and liver damage, similar to the phenotype observed in humans with NAFLD [12,19]. Thus, we review studies that use this model to study the effects of lipid intake. In addition, taking into account the articles found, as well as the experience of our group with this type of experiment, we focus on points not discussed in other reviews such as sex, age, and number of animals, the time of adaptation and treatment, amount and composition of fat diets, as well as dose, vehicle, and substances used as a control in the treatment. We also sought to present relevant information in this type of research, summarizing in tables and discussing possible barriers and doubts that may arise to the researcher who is considering conducting research using this model.

2. Materials and Methods

This review included articles published from 1 January 2014 to 13 May 2019, indexed in the National Center for Biotechnology Information Support Center's PubMed. For the selection of articles, PubMed Advanced Search Builder was used using the terms: NAFLD or Nonalcoholic Fatty Liver Disease, C57BL or mice, and lipid.

We considered studies that performed experiments with C57BL/6 mice (non-knockout) with NAFLD induction by hypercaloric diet, and whose treatment was based on lipids.

The database search resulted in 1103 eligible articles. After reading the titles and abstracts, 34 articles were selected for a full reading. In the end, 15 articles met all selection criteria and became part of this review, as outlined in Supplementary Material (Figure S1).

First, we addressed the common general characteristics of both methodologies, such as the initial age of the animals, sex, number of mice per group, adaptation period, and treatment time. Then, due

to the distinctions that lipid administration by gavage or diet implies, we chose to separate the studies into two distinct sections: oil administration included in diet and oil administration by oral gavage.

3. Results

In the fifteen studies that we analyzed, 46.67% performed the administration of oils by oral gavage, and 55.33% chose to insert the lipids in animal diets, as exemplified in Figure 1.

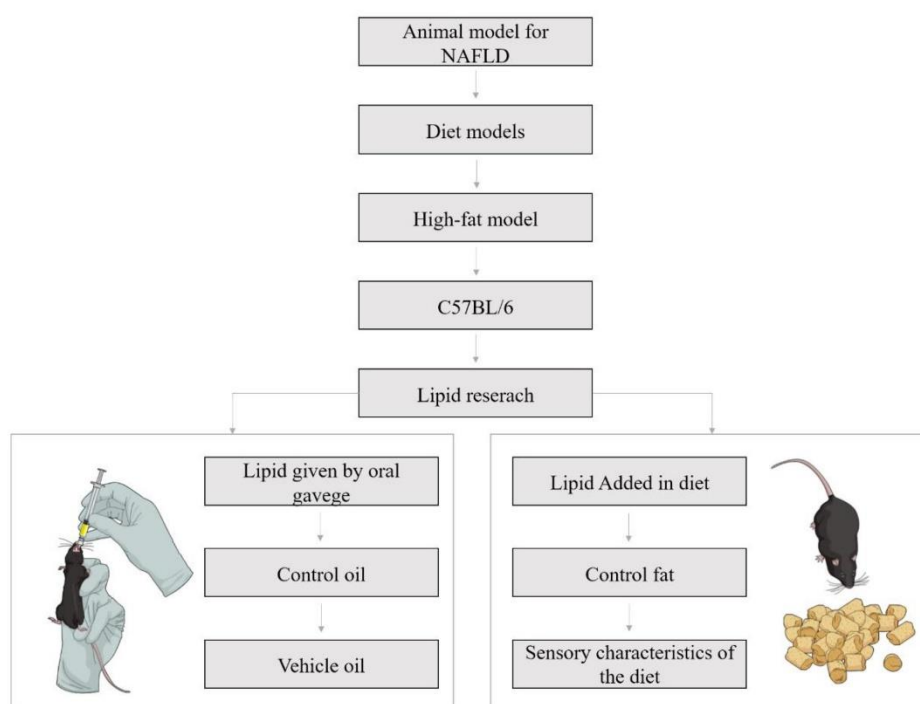


Figure 1. Nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 models for lipid research: key points of experimental design.

3.1. Experimental Design: General Aspects

Regarding the sex of the animals, all studies that presented this information claimed to have used male mice (Table 1). C57BL/6 male mice have been considered the standard in experiments with diet-induced obesity [20]. Yang et al. (2014) found out that male mice gain more body weight (93%, $n = 269$) than female mice (71%, $n = 255$), after 35 weeks of high-fat feeding. Furthermore, male mice fed on high fat show statistically significant differences in weight compared to the control than female mice [20].

No pattern was found regarding the number of animals, which ranged from a minimum of five to a maximum of 12 per group (Table 1). The age of the animals at the beginning of the experiment ranged from three to 15 weeks. However, some authors (20.00%) did not mention the age of the animals in the methodology. The adaptation time of the mice ranged from zero to two weeks.

To determine the existence and degree of hepatic steatosis, 60% of the studies used an imaging method (histology or stereology) combined with hepatic lipid quantification (using specific kits, colorimetric methods, or according to Folch et al. [21]). Regarding the others, 20% chose to perform only liver lipid quantification, and 20% opted for histological analysis alone.

Table 1. Sex, number of animals per group, age at the start of the experiment, time of adaptation, and time of treatment of the animals.

Gavage					
Ref.	Gender	Number of Animals Per Group	Age of Animals	Weeks of Adaptation	Experiment Duration after Adaptation (Weeks)
[22]	Male	8	6-weeks-old	2	12
[23]	Male	12	3–4-weeks-old	1	16
[24]	Male	10	–	2	12
[25]	–	7 or 8	5-weeks-old	1	12
[26]	Male	5 in control groups 9 in high-fat groups	4-weeks-old	0	12
[27]	Male	10 or 11	–	–	12
[28]	–	5	–	–	4
Lipids Included in Diet					
[29]	Male	6	5-weeks-old	–	12 weeks to promote NAFLD + 24 weeks of treatment
[30]	Male	–	5-weeks-old	3 days	12 weeks
[31]	Male	10	3 months of age	–	8 weeks
[32]	Male	10	3 months of age	–	12 weeks
[33]	Male	–	4-weeks-old	7 days	8 weeks
[34]	Male	12	9–10-weeks-old	–	12 weeks
[35]	Male	10	5-weeks-old	2 weeks	18 weeks
[36]	Male	–	14–15-weeks-old	–	15 weeks

Note: “–” means that the information was not provided by the authors. NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease.

The minimum treatment time was four weeks, and the maximum time was 36 weeks. However, 53.33% of the experiments adopted 12 weeks of treatment (Table 1). Obesity in C57BL/6 mice can be divided into three stages: the early stage, from week one to week four of high-fat feeding; the middle stage, from week four to week 15; and the late stage, from week 15 [37]. Therefore, the majority of studies opted to end the experiment during the late middle stage of obesity.

3.2. Oil Administration by Oral Gavage

3.2.1. Diet

Regarding the amount of fat present in the diet of experiments that chose to provide the oil by gavage, there is a pattern regarding the number of calories from fat. All experiments analyzed opted for a diet with 60% of total kcal from fat (Table 2).

Table 2. Group division and percentage of lipids in the diets of the experiments using gavage.

Ref.	Control Groups		Treatment Groups	
	Lean Control	Obese Control	Lean Treatment	Obese Treatment
[22]	13.5% kcal from fat	60% kcal fat content	–	60% kcal fat content
[23]	10% kcal from fat	60% kcal fat content	–	60% kcal fat content
[24]	13.5% kcal from fat	60% kcal fat content	–	60% kcal fat content
[25]	10% kcal from fat	60% kcal fat content	–	60% kcal fat content
[26]	10% kcal from fat	60% kcal fat content	10% kcal from fat	60% kcal fat content
[27]	10% kcal from fat	60% kcal fat content	10% kcal from fat	60% kcal fat content
[28]	standard mice diet	60% kcal fat content	–	60% kcal fat content

Lean control: Group that received a normocaloric diet and a control substance by oral gavage. Obese control: Group that received a high-fat diet and a control substance by oral gavage. Lean treatment: Group that received normocaloric diet and the studied lipid by oral gavage. Obese treatment: Group that received a high-fat diet and the studied lipid by oral gavage.

For the lean control groups, 57.14% of the experiments opted for a diet with 10% kcal from fat, 28.57% for 13.5% kcal from fat, and one study did not disclose the percentage of fat but mentioned using a standard rodent diet.

3.2.2. Dose

After analyzing the studies that administered the oral oil via gavage treatment and the authors' practical experience with this type of experiment, we surmise that this type of assay should be undertaken with an awareness of some important factors that differ from those inherent to other animal experiments.

Although gavage administration is the simplest method for performing accurate mice dosing, the stress caused by this procedure should be considered. In addition, there is a need for more time to perform daily procedures, and individuals responsible for administration should undergo specific training to ensure proper use of the technique, avoiding further damage to animals [38]. In an experimental study with C57BL/6 female mice ($n = 20$ per group), the possible adverse effects of using gavage with or without anesthesia were verified. The use of brief isoflurane as the anesthetic reduced the cases of incomplete intake of the content provided, and the loss of animals due to traumas caused by the technique. Thus, the authors advocate the use of anesthesia in studies that perform long-term gavage. Regarding weight gain, the control group that received no gavage and the groups that showed no differences in weight at the end of the experiment indicate that this technique may be a viable and unbiased alternative in experiments on obesity [39]. We reinforce that oral gavage can be a stressful procedure when performed improperly; researchers should be adequately trained to prevent possible animal deaths and excessive stress.

Table 3 shows the doses of oils administered to mice by gavage. Of the studies evaluated, 57.14% used values between 4 mg/kg/day and 125 mg/kg/day. In oil with a density of 0.8 g/mL, these values correspond to levels equivalent to 0.35–10.94 mL for a 70 kg person by direct conversion, or 0.028–0.7 mL if the conversion proposed by Reagan-shaw et al. is used [40].

Table 3. Dose and frequency of oil supplemented by oral gavage, gavage vehicle, and control substance.

Ref.	Dosage of Oil Given by Oral Gavage	Gavage Vehicle	Substance Administered to Control Groups
[22]	12.5, 62.5 or 125 mg/kg/day	–	Olive oil
[23]	100 mg/kg/day of Omega-3 PUFAS from fish oil, MO low DHA purity or MO high DHA purity	Corn oil	Corn oil
[24]	25, 50 or 100 mg/kg/day	Olive oil	Olive oil
[25]	250 or 500 mg/kg/week	–	Vehicle
[26]	1.94 mg ALA/g animal body weight/day	–	Saline solution
[27]	50 mg/kg/day	–	Saline solution
[28]	4, 8 or 16 mg/kg/day	–	–

Note: PUFAs, polyunsaturated fatty acids; MO, microalgal oil; DHA, docosahexaenoic acid; ALA, alpha-linolenic acid.

In the study by Yu et al. (2017), 100 mg/kg of Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were used, i.e., the amount of oil administered varied according to PUFA concentration. To circumvent this variation, the authors adjusted the final amount administered to the treatment groups using corn oil, and the control group received isovolumetric corn oil [23].

Another study, which defined the amount offered because of a specific component of the oil, was that of González-Mañán et al. (2017). The researchers administered 1.94 mg of alpha-linolenic acid (ALA) per gram of body weight of mice. According to the authors, the oil used had a concentration of 35% ALA, i.e., the final amount of oil offered was 5.54 mg of oil/g, equivalent to 5.54 g/kg. For mice with 30 g of body weight, this meant 166.2 mg of oil. Due to the low weight of a mouse, it can be difficult to understand how much this amount represents. To better assimilate this value, we can

draw a parallel with a 70 kg person, to which 5.54 g/kg would represent 31.02 mL, according to the conversion proposed by Reagan-shaw et al. Thus, as we commented, caution should be taken when defining the quantity of oil administered.

Only one experiment adopted gavage once a week. The set values were 250 or 500 mg/kg of body weight, which represents a weekly amount of 7.5 or 15 mg for a 30 g mouse. Considering that the gavage was performed weekly, this amount was similar to that of most of the other studies analyzed.

3.2.3. Vehicle

Depending on the amounts exemplified in the previous section and taking into account that oral gavage in mice is commonly performed with a proprietary gavage needle attached to a 1 mL insulin syringe, depending on the amount administered per animal, it is not possible to administer only the oil treatment and thus a vehicle substance is required. The choice of this vehicle may affect the study results, and it is essential that the authors describe in detail the procedure used. It is not possible to use an innocuous vehicle, such as a saline solution, because the oil treatment will not dissociate from it.

Only 28.57% of the studies made it clear to have used a vehicle in the methodology section. These studies mentioned having used olive oil or corn oil (Table 3). However, we emphasize that, according to the quantities administered, other experiments probably used vehicles and did not mention it in the methodology section of the studies.

3.2.4. Control Substance

Another fundamental point that should be present in the methodology section of the studies is the indication of the substance offered to the control groups. As already mentioned, the possible stress created by oral gavage should be mimicked in the control groups. Another factor to be taken into consideration is the calories generated by the oil treatment, which should also be present in this group. Also, because it is a lipid experiment, the calories added by it should also be considered. If a control oil is chosen, it should be evaluated whether it has characteristics that may affect the results of the experiment, such as inflammatory or anti-inflammatory capacity, orexigenic or sacietogen potential, laxative factors, etc.

3.3. Oil Administration Included in the Diet

3.3.1. Diet

The experiment design with the addition of oil to the diet does not allow exact control of the dose that each animal receives, only a percentage in relation to the total ingested in the diet. An advantage is that it avoids the stress caused by handling and storage, possibly not requiring daily handling of animals. However, it is important to emphasize that, according to the oil used, possible rancidity and oxidation of the compounds should be considered. To circumvent this adversity, researchers added 0.2 µg of t-butylhydroquinone/g of oil to mice diets and performed daily feed exchanges [30].

Unlike the experiments with gavage, we did not identify a pattern regarding the number of calories from fat in the experiments with added dietary oil. Quantities ranged from 32–60% of kcal from fat, as shown in Table 4. In the control groups, they ranged from 10 to 13%. Diets with 60% of the calories being from lipids are considered effective in promoting obesity and metabolic changes associated with the disease. However, some authors argue that this percentage exceeds the dietary habits common to Western diets [41,42].

The amount of sucrose in the diet of animals is also a factor that should be considered. Although both a high-fat diet and a high sucrose diet may lead to liver fat accumulation, this will happen through different mechanisms. For example, a sucrose-rich diet may lead to a further increase in de novo lipogenesis [43].

Regarding the groups with a hypercaloric diet, in 25% of the studies that we analyzed, there was no description of the amount of sucrose used. In 50% of the experiments, the amount was 100 g/kg. In the experiment that used the lowest amount, the diet consisted of 89 g/kg sucrose, but also 162 g/kg maltodextrin. Already the experiment that used more sucrose added a total of 203.75 g/kg.

Table 4. Group division and percentage of lipids in the diets of the experiments using lipids in studies that added it to the diet.

Ref.	Control Group		Treatment Group	
	Lean Control	Obese Control	Lean Treatment	Obese Treatment
[29]	13% kcal from fat	49% kcal fat content	Not applicable	49% kcal fat content
[30]	10% kcal from fat	35% kcal fat content	10% kcal from fat	35% kcal fat content
[31]	10% kcal from fat	50% kcal fat content	10% kcal from fat	50% kcal fat content
[32]	10% kcal from fat	50% kcal fat content	Not applicable	50% kcal fat content
[33]	–	46% kcal fat content	Not applicable	46% kcal fat content
[34]	12% kcal from fat	32% kcal fat content	Not applicable	32% kcal fat content
[35]	–	60% kcal fat content	Not applicable	60% kcal fat content
[36]	–	46,3% kcal fat content	Not applicable	46,3% kcal fat content

Lean control: Group that received a normocaloric diet. Obese control: Group that received a high-fat diet. Lean treatment: Group that received a normocaloric diet and the studied lipid replacing some component of the diet. Obese treatment: Group that received a high-fat diet and the studied lipid replacing some component of the diet.

It is noteworthy that the experiments that choose this design should adjust the percentage of kcal from fat in the control and treatment obese groups and even, depending on the objective of the work, consider balancing the amounts of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, for example, when comparing the ratio between omega-6 and omega-3. The authors highlighted the importance of matching the fat content (as shown in Table 5). Both experimental groups received equivalent amounts of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids, only differing in the ratio between omega-6 and omega-3. Thus, a possible bias caused by the difference between the percentage of fatty acid saturation was avoided. Therefore, the difference was limited to the type of polyunsaturated fatty acid in the diet [36].

In addition to the percentage change shown in Table 4, the composition of the diets also did not present a definite pattern (Table 5). Park et al. (2016) did not alter the sucrose content of the diet but did change the soybean oil of the control diet for the oil under study [30]. Bargut et al. (2014) maintained the amount of sucrose, increased the amount of casein in the obese groups in order to match the protein percentage with that of the control diet (10% of total protein calories). In addition, the lean treatment group received 36 g of fish oil in place of soybean oil, and the obese control group received 238 g/kg of fish oil while the obese control group received 238 g/kg of lard [31]. Chamma et al. (2017) Offered all groups the same amount of soybean oil and sucrose. Lean control groups received less casein and more corn starch, totalizing 75.8% of energy from carbohydrates, 14.3% of protein, and 9.9% of lipids. The obese groups received the same amount of casein, corn starch, and sucrose with different amounts of lard in change with medium-chain triacylglycerol (MCT) [32]. Beppu et al. (2017) also only change the amount of lard in the diet of the obese groups for starfish oil [33]. Soni et al. (2015) kept the same ingredients in all groups, the only change in diet was that the obese treatment group received 20 g/kg of fish oil and 30 g/kg of corn oil, while the obese control group received 50 g/kg of corn oil [34]. Yang et al. (2015) keep the same amount of all nutrients in the diet of experimental groups, with the exception of an exchange of 100 g/kg of lard for 100 g/kg of saury oil [35].

Table 5. Composition of the diets of the experiments using lipids in studies that added it to the diet.

Ref.	Diet Composition
[29]	HFD Control: Lard-based diet 49% total kcal of diet from fat HFD Treatment: 41.7% total kcal of diet from treatment oils
[30]	Lean Control: 45 g/1045.0 g (10% of kcal) from soybean oil and 350 g/1045.0 g of sucrose Lean Treatment: 45 g/1045.0 g (10% of kcal) from pine nut oil and 350 g/1045.0 g of sucrose HFD Control: 157.5 g/848.1 g of lard (35% of kcal), 45 g/848.1 g (10% of kcal) from soybean oil and 172.8 g/848.1 g of sucrose HFD Treatment: 157.5 g/848.1 g of lard (35% of kcal), 45 g/848.1 g (10% of kcal) from pine nut oil and 172.8 g/848.1 g of sucrose
[31]	Lean Control: 40 g/kg of soybean oil, 100 g/kg of sucrose and 140 g/kg of casein Lean Treatment: 36 g/kg of fish oil, 4 g/kg of soybean oil, 100 g/kg of sucrose and 140 g/kg of casein HFD Control: 238 g/kg of lard, 40 g/kg of soybean oil, 100 g/kg of sucrose and 175 g/kg of casein HFD Treatment: 238 g/kg of fish oil, 40 g/kg of soybean oil, 100 g/kg of sucrose and 175 g/kg of casein
[32]	Lean Control: 42 g/kg of soybean oil, 622.69 g/kg of cornstarch, 100 g/kg of sucrose, 42 g/kg of soybean oil and 136 g/kg of casein HFD Control: 236 g/kg of lard, 42 g/kg of soybean oil, 352.192 g/kg of cornstarch, 100 g/kg of sucrose, 42 g/kg of soybean oil and 170 g/kg of casein HFD + 25% MCT: 177 g/kg of lard, 42 g/kg of soybean oil, 61.5 g/kg of medium-chain triacylglycerol, 350.192 g/kg of cornstarch, 100 g/kg of sucrose, and 170 g/kg of casein HFD + 75% MCT: 59 g/kg of lard, 42 g/kg of soybean oil, 184.5 g/kg of medium-chain triacylglycerol, 345.192 g/kg of cornstarch, 100 g/kg of sucrose, and 170 g/kg of casein HFD + 100% MCT: 42 g/kg of soybean oil, 246 g/kg of medium-chain triacylglycerol, 342.692 g/kg of cornstarch, 100 g/kg of sucrose, and 170 g/kg of casein
[33]	HFD Control: 200 g/kg of lard, 200 g/kg of casein, 250 g/kg of corn starch, 100 g/kg of fructose, 100 g/kg of sucrose, and 50 g/kg of soybean oil HFD + 2% of Starfish Oil: 180 g/kg of lard, 200 g/kg of casein, 250 g/kg of corn starch, 100 g/kg of fructose, 100 g/kg of sucrose, 20 g/kg of starfish oil and 50 g/kg of soybean oil HFD + 5% of Starfish Oil: 150 g/kg of lard, 200 g/kg of casein, 250 g/kg of corn starch, 100 g/kg of fructose, 100 g/kg of sucrose, 50 g/kg of starfish and 50 g/kg of soybean oil
[34]	Lean Control: 222 g/kg of casein, 50 g/kg of sucrose, 560 g/kg of corn starch, 50 g/kg of cellulose, 25 g/kg of corn oil and 25 g/kg of coconut oil HFD Corn Oil Control: 256 g/kg of casein, 100 g/kg of sucrose, 348 g/kg of corn starch, 58 g/kg of cellulose, 100 g/kg of coconut oil and 50 g/kg of corn oil HFD Treatments: 256 g/kg of casein, 100 g/kg of sucrose, 348 g/kg of corn starch, 58 g/kg of cellulose, 100 g/kg of coconut oil, 30 g/kg of corn oil + 20 g/100 g of EPA and DHA-enriched oils
[35]	HFD Control: 258 g/kg of casein, 162 g/kg of maltodextrin, 89 g/kg of sucrose, 65 g/kg of cellulose, 320 g/kg of lard, and 32 g/kg of soybean oil HFD Treatment: 258 g/kg of casein, 162 g/kg of maltodextrin, 89 g/kg of sucrose, 65 g/kg of cellulose, 220 g/kg of lard, 32 g/kg of soybean oil and 100 g/kg of saury oil
[36]	HFD Control: 40.8% SFA, 42.0% MUFA and 17.3% PUFA (15.9% Omega-6 and 1.4% Omega-3) (Lard and soybean-based diet) HFD Treatment: 41.5% SFA, 41.4% MUFA and 17.1% PUFA (12.5% Omega-6 and 4.6% Omega-3) (Lard, soybean oil and Menhaden fish oil-based diet)

Note: HFD, high-fat diet; MCT, medium-chain triacylglycerol; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids. Lean control: Group that received a normocaloric diet. HFD control: Group that received a high-fat diet. Lean treatment: Group that received a normocaloric diet and the studied lipid replacing some component of the diet. HFD treatment: Group that received a high-fat diet and the studied lipid replacing some component of the diet.

3.3.2. Dose and Control Substance

The lipids used to compose the control diet and the animal treatment varied among experiments (Table 5). Park et al. (2016) conducted an experiment with four groups of C57BL/6 mice, two control groups with 10% of the energy from lipids, and two HFD groups with 45% of the energy from fat. One control group received all lipids from pine nut oil (PNO), and the other received all lipids from soybean oil (SBO). The high-fat diet (HFD) groups received 35% from lard and 10% from

PNO or SBO [30]. The authors pointed out that SBO was chosen to compose the diet because its fatty acid composition is similar to that of PNO. To avoid oxidation of polyunsaturated oils, 0.2 µg of t-butylhydroquinone/g of oil was added to the diet.

However, some studies have changed the amount of lard in diets [33,35,44]. In the research conducted by Chamma et al. (2017), the fat control group received 236 g/kg of lard and 42 g/kg of soybean, and the treatment groups received 25%, 75% or 100% of medium-chain triacylglycerol (MCT) replacing lard, keeping the amount fixed at 42 g/kg of soy oil.

In 87.5% of the experiments analyzed, the authors chose to offer diets containing lard as the main source of lipids (Table 5). Of these, 57.14% made it clear that the diets of the treatment groups received the lard treatment oil, and only one experiment [30] chose to replace the soybean oil for the treatment oil of the control diet, maintaining the same amount of lard.

Only one experiment did not have a lard-based diet but rather used coconut oil. The authors of this research also opted to replace the treatment oil for the control diet's corn oil [34].

The consistency, conservation, and palatability of the diet is a fundamental point in this type of experiment, as a change in any of these factors may bias the experiment. In this sense, Jurado-Ruiz et al. (2016) pointed out that the smell of fish oil may reduce the feed intake of animals. To circumvent this possible adversity, the authors added bacon flavoring to the diet, as well as 0.2 µg of t-butylhydroquinone/g oil, to avoid lipid oxidation [30].

4. Conclusions

We conclude by this review that there is standardization in the amount of fat percentage in the diet of gavage experiments, amount of dietary fat in control groups, type of fat used to compose most of the diet in diets with added oil, and the sex of the animals. However, we did not find a standardization regarding age and quantity of animals per group, time of adaptation, duration of the experiment, amount of lipids used in treatment, the vehicle used for storage, and the substance offered to control groups. It is worth mentioning that these are relevant aspects of the analysis of the quality and replicability of experiments. In some cases, they were not described in the methodology of the studies. Establishing a standard model can be a complicated task since defining the best methodology is practically impossible, given the many variables of biological models. However, standardization should be encouraged since its absence makes it difficult to advance researches in this field. Furthermore, it is essential that variables that may influence the final result to be described. Only then can new experiments confirm the results obtained by or that rely on the performance of new intervention proposals.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/12/3067/s1>, Figure S1: Flowchart of the methodology used to choose the articles that comprised this review.

Author Contributions: Conceptualization, L.R.A., E.F.d.S., and M.L.R.M.; methodology, L.R.A., E.F.d.S., and M.L.R.M.; investigation, L.R.A.; data curation, L.R.A., L.A.d.A., R.S.d.S., A.C.J., E.F.d.S., and M.L.R.M.; writing-original draft preparation, L.R.A., L.A.d.A., R.S.d.S., A.C.J., E.F.d.S., and M.L.R.M.; writing-review and editing, L.R.A., L.A.d.A., R.S.d.S., A.C.J., E.F.d.S., and M.L.R.M.; visualization, L.R.A.; supervision, E.F.d.S. and M.L.R.M.; project administration, E.F.d.S. and M.L.R.M.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship awarded.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Younossi, Z.M.; Koenig, A.B.; Abdelatif, D.; Fazel, Y.; Henry, L.; Wymer, M. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology* **2016**, *64*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Araújo, A.R.; Rosso, N.; Bedogni, G.; Tiribelli, C.; Bellentani, S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int.* **2018**, *38*, 47–51. [CrossRef]
3. Abenavoli, L.; Milic, N.; Di Renzo, L.; Preveden, T.; Medic-Stojanoska, M.; De Lorenzo, A. Metabolic aspects of adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 7006–7016. [CrossRef]
4. Abenavoli, L.; Boccuto, L. Nonalcoholic fatty liver disease in obese adolescents: The role of genetic polymorphisms. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **2019**, *8*, 179–180. [CrossRef] [PubMed]
5. Abenavoli, L.; Abenavoli, L.; Di Renzo, L.; Boccuto, L.; Alwardat, N.; Gratteri, S.; De Lorenzo, A. Health benefits of Mediterranean diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *12*, 873–881.
6. Buzzetti, E.; Pinzani, M.; Tsochatzis, E.A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism* **2016**, *65*, 1038–1048. [CrossRef]
7. Machado, M.; Marques-Vidal, P.; Cortez-pinto, H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J. Hepatol.* **2006**, *45*, 600–606. [CrossRef] [PubMed]
8. WHO Global Health Observatory (GHO) Data. Available online: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/ (accessed on 15 February 2019).
9. FAO; OPAS. *Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional*; FAO: Santiago, Chile, 2017.
10. Ferramosca, A.; Di Giacomo, M.; Zara, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 4146–4157. [CrossRef]
11. Kanunfre, C.C. PPAR - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma: um receptor nuclear para ácidos graxos. In *Entendendo a Gordura: Os Ácidos Graxos*; Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C.K., Procopio, J., Eds.; Manole: Barueri, Brazil, 2002; pp. 227–248. ISBN 85-204-1355-2.
12. White, P.A.S.; Cercato, L.M.; Araújo, J.M.D.; Souza, L.A.; Soares, A.F.; Barbosa, A.P.O.; Neto, J.M.D.R.; Marçal, A.C.; Machado, U.F.; Camargo, E.A.; et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2013**, *57*, 339–345. [CrossRef] [PubMed]
13. Jump, D.B.; Depner, C.M.; Tripathy, S.; Lytle, K.A. Impact of dietary fat on the development of non-alcoholic fatty liver disease in Ldlr^{-/-} mice. *Proc. Nutr. Soc.* **2016**, *75*, 1–9. [CrossRef]
14. Riordan, J.D.; Nadeau, J.H. Modeling progressive non-alcoholic fatty liver disease in the laboratory mouse. *Mamm. Genome* **2014**, *25*, 473–486. [CrossRef]
15. Takahashi, Y.; Soejima, Y.; Fukusato, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 2300–2308. [CrossRef]
16. Jacobs, A.; Warda, A.; Verbeek, J.; Cassiman, D.; Spincemaille, P. An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2016**, *6*, 185–200. [CrossRef] [PubMed]
17. Ka, J.; Lau, C.; Zhang, X.; Yu, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: Current perspectives and recent advances. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 36–44.
18. Van Herck, M.A.; Vonghia, L.; Francque, S.M. Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver. *Nutrients* **2017**, *9*, 1072. [CrossRef]
19. Rocchini, A.P.; Marker, P.; Cervenka, T. Time course of insulin resistance associated with feeding dogs a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **1997**, *272*, E147–E154. [CrossRef] [PubMed]
20. Yang, Y.; Smith, D.L., Jr.; Keating, K.D.; Allison, D.B.; Nagy, T.R. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity* **2015**, *22*, 2147–2155. [CrossRef]
21. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
22. Lai, Y.S.; Lee, W.C.; Lin, Y.E.; Ho, C.T.; Lu, K.H.; Lin, S.H.; Panyod, S.; Chu, Y.L.; Sheen, L.Y. Ginger Essential Oil Ameliorates Hepatic Injury and Lipid Accumulation in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2062–2071. [CrossRef]
23. Yu, J.; Ma, Y.; Sun, J.; Ran, L.; Li, Y.; Wang, N.; Yu, T.; Gao, W.; Jia, W.; Jiang, R.; et al. Microalgal Oil from Schizochytrium sp. Prevents HFD-Induced Abdominal Fat Accumulation in Mice. *J. Am. Coll. Nutr.* **2017**, *36*, 347–356. [CrossRef]

24. Lai, Y.S.; Chen, W.C.; Ho, C.T.; Lu, K.H.; Lin, S.H.; Tseng, H.C.; Lin, S.Y.; Sheen, L.Y. Garlic essential oil protects against obesity-triggered nonalcoholic fatty liver disease through modulation of lipid metabolism and oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5897–5906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, G.W.; Jo, H.K.; Chung, S.H. Ginseng seed oil ameliorates hepatic lipid accumulation in vitro and in vivo. *J. Ginseng Res.* **2018**, *42*, 419–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. González-Mañán, D.; D'Espessailles, A.; Dossi, C.G.; Martín, M.S.; Rodrigo, M.; Mancilla, A.R.; Gladys, S.T. Rosa Mosqueta Oil Prevents Oxidative Stress and Inflammation through the Upregulation of PPAR- α and NRF2 in C57BL/6j Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Nutr.* **2017**, *147*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hernández-Rodas, M.C.; Valenzuela, R.; Echeverría, F.; Rincón-Cervera, M.Á.; Espinosa, A.; Illesca, P.; Muñoz, P.; Corbari, A.; Romero, N.; Gonzalez-Mañán, D.; et al. Supplementation with Docosahexaenoic Acid and Extra Virgin Olive Oil Prevents Liver Steatosis Induced by a High-Fat Diet in Mice through PPAR- α and Nrf2 Upregulation with Concomitant SREBP-1c and NF- κ B Downregulation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1–6. [[CrossRef](#)]
28. Bashir, S.; Ali, S.; Khan, F. Partial reversal of obesity-induced insulin resistance owing to anti-inflammatory immunomodulatory potential of flaxseed oil. *Immunol. Investig.* **2015**, *44*, 451–469. [[CrossRef](#)]
29. Jurado-Ruiz, E.; Varela, L.M.; Luque, A.; Berná, G. An extra virgin olive oil-rich diet intervention ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis induced by a high-fat “Western type” diet in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *61*, 1600549. [[CrossRef](#)]
30. Park, S.; Shin, S.; Lim, Y.; Shin, J.H.; Seong, J.K.; Han, S.N. Korean pine nut oil attenuated hepatic triacylglycerol accumulation in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients* **2016**, *8*, 59. [[CrossRef](#)]
31. Bargut, T.C.L.; Frantz, E.D.C.; Mandarim-De-Lacerda, C.A.; Aguila, M.B. Effects of a diet rich in n-3 polyunsaturated fatty acids on hepatic lipogenesis and beta-oxidation in mice. *Lipids* **2014**, *49*, 431–444. [[CrossRef](#)]
32. De Oliveira Chamma, C.M.; Bargut, T.C.L.; Mandarim-De-Lacerda, C.A.; Aguila, M.B. A rich medium-chain triacylglycerol diet benefits adiposity but has adverse effects on the markers of hepatic lipogenesis and beta-oxidation. *Food Funct.* **2017**, *8*, 778–787. [[CrossRef](#)]
33. Beppu, F.; Li, H.; Yoshinaga, K.; Nagai, T.; Yoshinda, A.; Kubo, A.; Kanda, J.; Gotoh, N. Dietary Starfish Oil Prevents Hepatic Steatosis and Hyperlipidemia in C57BL/6N Mice Fed High-fat Diet. *J. Oleo Sci.* **2017**, *769*, 761–769. [[CrossRef](#)]
34. Soni, N.K.; Nookaew, I.; Sandberg, A.S.; Gabrielsson, B.G. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched high fat diet delays the development of fatty liver in mice. *Lipids Health Dis.* **2015**, *14*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yang, Z.H.; Inoue, S.; Taniguchi, Y.; Miyahara, H.; Iwasaki, Y.; Takeo, J.; Sakaue, H.; Nakaya, Y. Long-term dietary supplementation with saury oil attenuates metabolic abnormalities in mice fed a high-fat diet: Combined beneficial effect of omega-3 fatty acids and long-chain monounsaturated fatty acids. *Lipids Health Dis.* **2015**, *14*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lazic, M.; Inzaugarat, M.E.; Povero, D.; Zhao, I.C.; Chen, M.; Nalbandian, M.; Miller, Y.I.; Cherniavsky, A.C.; Feldstein, A.E.; Sears, D.D. Reduced dietary omega-6 to omega-3 fatty acid ratio and 12/15-lipoxygenase deficiency are protective against chronic high fat diet-induced steatohepatitis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lin, S.; Thomas, T.C.; Storlien, L.H.; Huang, X.F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57B1/6j mice. *Int. J. Obes.* **2000**, *24*, 639–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Patten, A.R.; Fontaine, C.J.; Christie, B.R. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. *Front. Pediatr.* **2014**, *2*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jones, C.P.; Boyd, K.L.; Wallace, J.M. Evaluation of Mice Undergoing Serial Oral Gavage While Awake or Anesthetized. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2016**, *55*, 805–810. [[PubMed](#)]
40. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **2008**, *22*, 659–661. [[CrossRef](#)]
41. Della Vedova, M.C.; Muñoz, M.D.; Santillan, L.D.; Plateo-Pignatari, M.G.; Germanó, M.J.; Rinaldi Tosi, M.E.; Garcia, S.; Gomez, N.N.; Fornes, M.W.; Gomez Mejiba, S.E.; et al. A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Insights* **2016**, *9*, 93–102. [[CrossRef](#)]

42. Tetri, L.H.; Basaranoglu, M.; Brunt, E.M.; Yerian, L.M.; Neuschwander-Tetri, B.A. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *295*, 987–995. [[CrossRef](#)]
43. Cahova, M.; Dankova, H.; Palenickova, E.; Papackova, Z.; Kazdova, L. The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on fatty acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *2012*, 1–10. [[CrossRef](#)]
44. Alcala, M.; Calderon-Dominguez, M.; Serra, D.; Herrero, L.; Ramos, M.P.; Viana, M. Short-term vitamin E treatment impairs reactive oxygen species signaling required for adipose tissue expansion, resulting in fatty liver and insulin resistance in obese mice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]














© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

APÊNDICE 3. ARTIGO DE RESULTADOS

AYDOS, Leonardo Recena; AMARAL, Luane Aparecida; JACOBOWSKI, Ana Cristina; SOUZA, Roberta Serafim; PARISOTTO, Eduardo Benedetti; MENEZES, Mariana Biava; BITTENCOURT JUNIOR, Felipe Francisco; FERNANDES, Emely Schuindt; SILVA, landara Schettert; PORTUGAL, Luciane Candeloro. Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in c57bl/6 mice. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition**, [S.L.], p. 1-12, 23 nov. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.13473>.

Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in c57bl/6 mice

Leonardo Recena Aydos^{1,2,3}  | Luane Aparecida do Amaral^{1,3}  |
Ana Cristina Jacobowski^{2,4}  | Roberta Serafim de Souza^{1,2,3}  |
Eduardo Benedetti Parisotto⁴  | Mariana Biava de Menezes⁴  |
Felipe Francisco Bittencourt Junior^{5,6}  | Emely Schuindt Fernandes^{5,6} |
Iandara Schettert Silva^{3,7}  | Luciane Candelero Portugal⁸  |
Cláudio Gonçalves Oliveira⁸ | Gustavo Tsuyoshi Senra Masuko³ |
Leandro Fontoura Cavalheiro⁹  | Carlos Eduardo Domingues Nazário⁹  |
Elisvânia Freitas dos Santos⁴  | Maria Lígia Rodrigues Macedo^{2,4} 

¹Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Faculty of Medicine (FAMED), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

²Protein Purification Laboratory and its Biological Functions (LPPFB), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

³Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food, and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

⁵Faculty of Biological and Health Sciences, University Center of Grande Dourados (UNIGRAN), Dourados – MS, Brazil

⁶Clinical analysis laboratory, University Center of Grande Dourados (UNIGRAN), Dourados – MS, Brazil

⁷Laboratory of Experimental Disease Models, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

⁸Bioscience Institute (INBIO), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

⁹Institute of Chemistry (INQUI), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil

Correspondence

Leonardo Recena Aydos, Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region, Faculty of Medicine (FAMED), Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande – MS, Brazil. Email: leonardoaydos@gmail.com

Funding information

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) and obesity are growing in many parts of the world, becoming public health problems. It is proposed that foods with functional properties can assist in the treatment of these diseases. Crude buriti pulp oil (BPO) is a food traditionally consumed by residents in the Pantanal, Cerrado and Brazilian Amazon. It is rich in oleic acid, tocopherols and carotenoids, emerging as a potential functional food. Thus, this study aimed to evaluate the effect of the supplementation of BPO on metabolic disorders caused by a high-fat diet. Four groups of C57BL/6 mice were used, a lean group with AIN-93M diet and control oil supplementation, an obese group with a high-fat diet and control oil supplementation, and two obese groups with a high-fat diet and BPO supplementation in the amounts of 50 and 100 mg/kg. BPO worsened the metabolic state caused by the high-fat diet, worsening risk factors associated with MetS, as the abdominal circumference and retroperitoneal fat, serum levels of total cholesterol, uric acid, alanine transaminase, glucose and triglycerides, and renal fat, in addition to changes in glycaemic control and oxidative stress markers. C57BL/6 mice fed with a high-fat diet and supplemented with BPO presented a worsening in metabolic risk factors associated with MetS.

KEYWORDS

high-fat diet, metabolic syndrome, obesity

1 | INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) is a complex and multifactorial state characterized by the presence of a set of risk factors as abdominal obesity, insulin resistance, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), dyslipidaemia, hyperglycaemia and cardiometabolic risk factors that can increase the prevalence of diabetes, coronary heart disease, atherosclerotic diseases and others morbidities (Kassi et al., 2011; Priest & Tontonoz, 2019).

The prevalence of MetS varies according to the population, generally with prevalence between 20% and 40% (Engin, 2017). The most common component found in individuals with MetS is abdominal obesity (Engin, 2017). Waist circumference is correlated with visceral fat accumulation, and this measure has a probability of 0.94 (95% confidence interval 0.88–0.99) to predict the existence of hepatic steatosis (Borrueal et al., 2014).

The obesity epidemic is a worldwide public health problem; according to the Global Health Observatory data repository, in 2016, the number of overweight individuals (body mass index—BMI \geq 25) reached 39% of the world population, while the number of obese people (BMI \geq 30) reached 13.1% (WHO, 2019). In Latin America and the Caribbean, excessive weight affects an even higher percentage of individuals, as 58% of the population is overweight and 23% is obese (FAO, OPS, & WFP, 2019).

It has been well described that oxidative damage is positively correlated with obesity (Fernández-Sánchez et al., 2011) and plays an important role in the establishment and progression of NAFLD,

increasing inflammation, insulin resistance and contributing to the progression of liver fibrosis (Besse-Patin & Estall, 2014; Ferramosca et al., 2017; Masarone et al., 2018; Tsuchida & Friedman, 2017).

It is hypothesized that reestablish the redox state in the liver and adipose tissue can be a strategy to alleviate obesity (Furukawa et al., 2017). So, foods with antioxidant nutrients and bioactive compounds can be adjuvants in the treatment of MetS and the disorders associated with it. In this context, crude buriti pulp oil (BPO) appears as a potential functional food.

The Buritizeiro is one of the largest palm trees in the Brazilian territory and can reach up to 35 metres in height (Cymerys et al., 2005; Ferreira, 2008). The fruit of the buriti has a rigid and scaly (epicarp) rind of brown colour. Its pulp (mesocarp) is oily and has an orange colour that can become reddish, according to its ripening state (Figure 1). Buriti is an important source of nutrients for animals and local populations that live in the biome of Cerrado, Pantanal and Amazon (Silva et al., 2009). In flooded areas, there are approximately 130 to 155 buriti palm trees per km². Each tree produces on average 200 kg of fruits (Cymerys et al., 2005; Ferreira, 2008).

The oil principal components are oleic (72.6%–78.7%) and palmitic acid (19.2%–19.6%) (Albuquerque et al., 2005; Aquino et al., 2012; Medeiros et al., 2015). Also, buriti is recognized as a source of carotenoids. The Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) listed the use of buriti to supply nutritional deficiencies in poor communities in the Amazon (Filho & Lima, 2001). Also, it has been shown that the intake of buriti candy for 20 days by children aged 3 to 12 years was able to eliminate symptoms related to vitamin A deficiency.

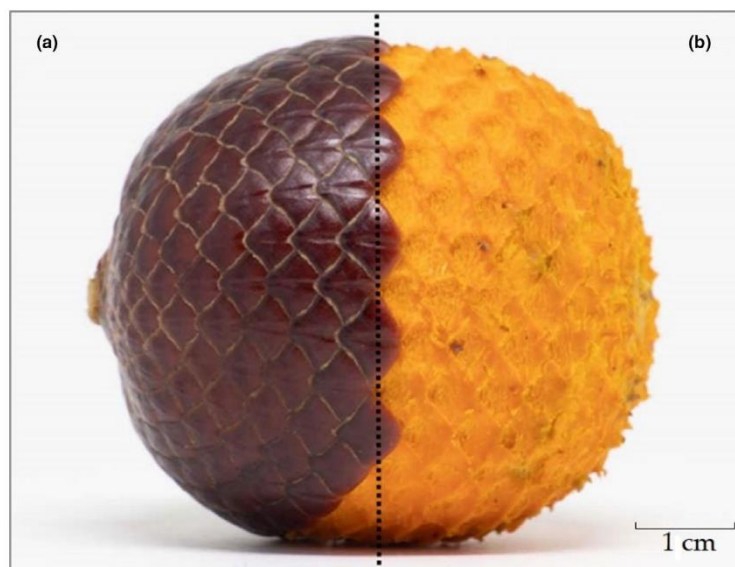


FIGURE 1 Buriti fruit (*Mauritia flexuosa*). (a)—Scaled epicarp. (b)—Mesocarp. Source: Authors

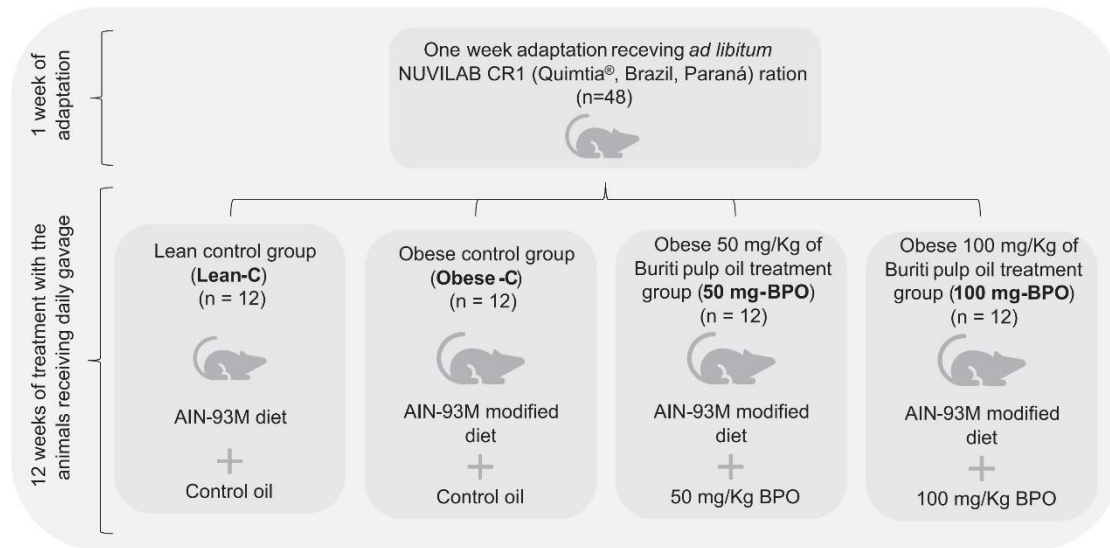


FIGURE 2 Experimental design. Crude buriti pulp oil (BPO)

Handcrafted BPO has total carotenoid content ranging from 1661 to 1,890 mg/kg (Albuquerque et al., 2005; Aquino et al., 2012; Garcia-Quiroz et al., 2003; Silva et al., 2009). In humans, low levels of serum β -carotene (Christensen & Thomas Lawler, 2019; Wang et al., 2019; Xiao et al., 2019) and lower intake (Christensen & Thomas Lawler, 2019) are positively correlated with the severity of the hepatic injury caused by NAFLD.

Another possible mechanism of action of BPO is its tocopherol content. Vitamin E has been well documented as a treatment for NAFLD (Rinella, 2015), and BPO has a total of α -tocopherol ranging from 1,099 to 1,343 mg/kg and 647 to 918 mg/kg of β -tocopherol (Silva et al., 2009).

However, few animal experiments have investigated the possible benefits and risks of ingesting crude buriti pulp oil. And, so far, no studies have been carried out regarding the use of BPO as prevention of NAFLD and obesity-related metabolic changes.

Therefore, the objective of this research was to verify the effects of the supplementation of BPO in the metabolic changes correlated with the MetS caused by a high-fat diet, such as dysregulation in glucose homeostasis and lipid profile, accumulation of fat in the visceral region and alteration of markers related to cardiometabolic risk and NAFLD.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

For this study, were used 48 male C57BL/6 mice from Central Bioterium—Technical Unit of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). The experiment was conducted at a multi-user Laboratory of Experimental Disease Models from UFMS. The animals were received at the age of twenty-one days and went through a week of

adaptation to the new location. All animals were housed in individual cages in Micro Insulated Ventilated Rack (Alesco®, Campinas, Brazil, São Paulo) with a temperature of $21 \pm 2^\circ$, the humidity of $60 \pm 10\%$ and a 12-hr light-dark cycle with night cycle beginning at 7 p.m. After being received, the animals went through a week of adaptation before the treatment starts. The treatment was conducted for 12 weeks. Euthanasia was performed according to established rules of good conduct in animal experiments. The animals fasted for eight hours and were anaesthetized with isoflurane (inhalation) before euthanasia. After exsanguination, the animals received overdose of anaesthesia to ensure death.

2.2 | Experimental design

Animals were divided into four groups (Figure 2). The lean control group (Lean-C), that received the AIN-93M diet, and three other groups that received AIN-93M modified diet: the obese control group (Obese-C), the 50 mg/kg of BPO group (50mg-BPO) and the 100 mg/kg of BPO group (100mg-BPO).

Lean-C and Obese-C received control oil by daily gavage. The 50mg-BPO group received 50 mg/kg of BPO by daily gavage and the 100mg-BPO group received 100 mg/kg of BPO by daily gavage.

Olive oil was used as a control oil. For treatment oil administration, a stock solution with BPO and olive oil was used. All groups had daily received by gavage an isovolumetric quantity of oil per kilogram of body weight at the dose of 0.01 ml/g. For example, a 30-gram mouse of the control group received 0.3 ml of olive oil, while a 30-gram mouse of the 50mg-BPO group received a stock solution containing 50 mg/Kg of BPO and olive oil to complete 0.3 ml. Gavage was performed during the fasting period of the animals for 12 weeks at 9 a.m.

Body weight and food intake were measured once a week. The amount of oil administered to the animals was based on weekly body weight measurements.

2.3 | Diets

During the adaptation week, all animals received NUVILAB CR1 (Quimtia[®], Brazil, Paraná) ration. Then, the control lean group received the AIN-93M diet (Reeves et al., 1993) while obese groups received a high-fat AIN-93M-modified diet, to induce obesity. The AIN-93M diet and AIN-93M-modified diet was provided by RHOSTER[®] (Brazil, São Paulo). The high-fat diet had the same composition of the AIN-93M diet, but with the exchange of starch for lard to make the diet hyperlipidaemic and hypercaloric, reaching 17,99 g/100 g of total protein (13,55% of kcal), 36,44 g/100 g of carbohydrates (27,44% of kcal) and 34,82 g/100 g of lipids (59,01% of kcal).

2.4 | Buriti pulp oil extraction

The fruits of Buriti were collected at the Campo Grande Campus of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) (20°29'55.8"S; 54°36'45.5"W). The specimens were selected and washed in running water and then sanitized in chlorinated solution (200 mg/L) for 15 min. The fruits were peeled manually, and the pulps (mesocarp) were removed. The separated pulps were oven-dried at 40°C for 4 hr. Subsequently, extraction of BPO was achieved using a manual press, the same model that is commonly used and sold for oil production by the local population from the state of Mato Grosso do Sul. The crude buriti pulp oil principal components were 76.45% ($\pm 0.04\%$) of oleic acid and 18.37% ($\pm 0.04\%$) of palmitic acid (mean \pm standard deviation). The full fatty acid profile is presented in supplemental Table S1.

2.5 | Oral glucose tolerance test

The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at the beginning of the twelfth week of treatment. The animals fasted for 6 hr before the test. Due to the obese groups, to avoid bias (Ayala et al., 2010) a dose of 1 g/kg of glucose diluted in 0.01 ml/g of water given by oral gavage was defined. For plasma glucose analyses, 50 μ l of blood was sampled after a tail cut at 0, 15, 30, 60, and 120 min. Plasma glucose was measured with a glucometer (INJEX[®] Sens[™] II, Brazil, São Paulo).

2.6 | Histology

The criteria of the histopathological analysis were adapted from (Pokorska-Śpiwak et al., 2017). The scoring model was used to define the absence or presence of lesions and the degree of injury

when present: steatosis (fatty degeneration), necrosis, vasodilation, leucocyte infiltrate, hyaline degeneration, hydropic degeneration and fibrosis.

2.7 | Plasma analyses

Plasma levels of glucose, total protein, creatinine, total cholesterol, albumin, uric acid, urea, triglycerides, aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) were analysed in COBAS[®] C111 automation (Roche—Germany), calibrated and following internal and external quality control (from the National Quality Control Program—PNCQ) through spectrophotometry (kinetics for enzymes and colorimetric for the other analytes), according to the manufacturer guidelines.

2.8 | Oxidative stress markers

For thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) samples of the liver and epididymal adipose tissue were homogenized in a cold buffer containing 20nM sodium phosphate, with pH 7.4, 150nM NaCl (1:20 w/v) and 0.1% Triton. The homogenates were centrifugated for 5 min (5000g), and the determinations were then performed using the supernatants. To perform reduced glutathione (GSH) assay, an acid extract was prepared with samples of tissue and 12% trichloroacetic acid (TCA), 1:10 w/v.

2.8.1 | Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

To estimate liver and adipose tissue lipoperoxidation a TBARS assay was performed following the method of Ohkawa and Bird and Draper (Bird & Draper, 1984).

2.8.2 | Reduced glutathione assay

GSH was determined according to Beutler et al. (1963). The acid extracts described above were centrifugated for 5 min (5000 g), and the supernatants were added to 2.5 nM DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) in 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 8.0. Then, the formation of the yellow thiolate anion was measured at 412 nm.

2.9 | Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). To test the normality distribution of data, a Kolmogorov–Smirnov normality test with Dallal–Wilkinson–Lillie for P-value was performed. For data that presented normal distribution, an ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test

was performed, and for data without normal distribution, a Kruskal–Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test was used. Data with P -value < 0.05 were considered as statistically significant. All data were performed at Prism 8 version 8.2.0.

3 | RESULTS

3.1 | Anthropometric measurements, liver weight and feed intake

At the beginning of the experiment, animals were separated in a way that all groups had statistically the same weight. After 12 weeks, Lean-C group presented lower weight compared with the other groups. Although treatment groups, especially the 50mg-OPB group, showed numerically greater fat weight-to-body weight when compared to the Obese-C group, the mean was not statistically different. Also, the abdominal circumference was higher in both treatment groups (Table 1).

Figure 3 shows the feed intake and weight of animals during the experiment. Groups that received a high-fat diet consume

statistically the same amount of diet during the role experiment and gained more weight than the Lean-C group.

3.2 | Plasma analysis

Serum glucose, total cholesterol, uric acid and ALT were higher in the 100mg-BPO group when compared to the Lean-C group, and triglycerides were higher than all other groups. Also, 50mg-BPO showed a higher level of uric acid than Lean-C and Obese-C groups (Table 2).

3.3 | Histological analysis

3.3.1 | Adipose tissue

As shown in Figure 4 and Table 3, the Lean-C group had smaller adipocytes when compared to other groups. Regarding the obese groups, the 50mg-BPO group had adipocytes with an area statistically equal to the Obese-C group, whereas the 100 mg group presented the lowest adipocytes area.

TABLE 1 Anthropometric measurements and liver weight in animals

Parameters	Lean-C	Obese-C	50mg-BPO	100mg-BPO
Initial weight (g)	21.14 ± 0.63	21.32 ± 0.59	21.21 ± 0.52	21.6 ± 0.54
Final weight (g)	26.75 ± 0.74	33.55 ± 0.81***	35.88 ± 1.15****	35.75 ± 1.06****
Liver weight (g)	1.22 ± 0.04	1.25 ± 0.07	1.23 ± 0.04	1.22 ± 0.05
Retroperitoneal fat (g)	0.14 ± 0.02	0.60 ± 0.05****	0.82 ± 0.02**** and ##	0.69 ± 0.06****
Epididymal fat (g)	0.41 ± 0.02	1.69 ± 0.06	1.81 ± 0.10	1.88 ± 0.11
Abdominal circumference (cm)	5.81 ± 0.10	7.30 ± 0.14***	7.97 ± 0.16*** and ##	8.04 ± 0.14*** and ##

Note: Data are present in mean ± standard error of mean (SEM). The markers *** and **** mean different from Lean-C at $p < .005$ and $p < .001$, respectively, and ## means different from Obese-C at $p < .01$. Crude buriti pulp oil (BPO).

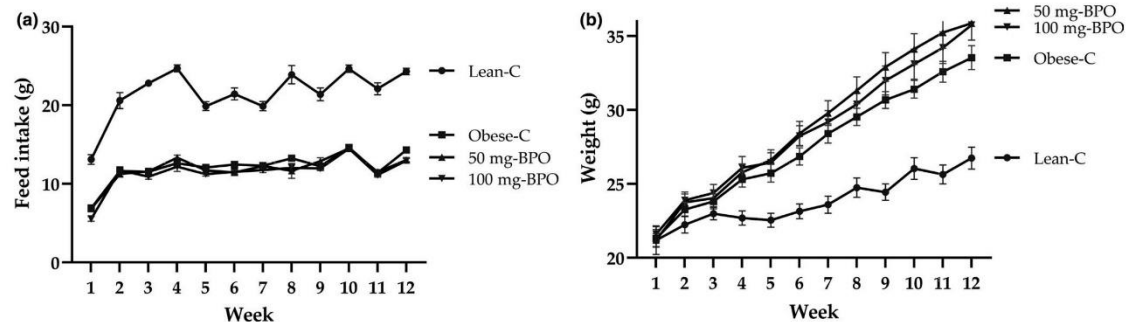


FIGURE 3 Feed intake of groups during the experiment. (a) Feed intake was low during the first week, possibly due to feeding exchange and/or stress caused by gavage. After the first week, the consumption normalized. The Control-C group ingested a higher amount in grams of feed when compared to obese groups, but the diet provided to the obese groups had higher calories per kilogram and higher fat percentage, so these groups gained more weight. (b) Animals' weight throughout the experiment. Control-C was statistically different from other groups at $p < .0001$, and the obese groups had no difference with each other. Data are present in mean ± standard error of mean (SEM). Crude buriti pulp oil (BPO)

TABLE 2 Plasma biochemical analysis

Parameters	Lean-C	Obese-C	50mg-BPO	100mg-BPO
Glucose (mg/dl)	230.00 ± 22.65	255.60 ± 15.94	292.70 ± 21.12	320.50 ± 14.11*
Total protein (g/l)	26.02 ± 4.15	24.59 ± 3.29	25.21 ± 3.39	34.42 ± 3.65
Creatinine (mg/dl)	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.26 ± 0.02
Total cholesterol (mg/dl)	66.78 ± 5.12	96.70 ± 6.29	106.00 ± 8.07	119.90 ± 10.92**
Albumin (g/L)	19.64 ± 2.99	27.14 ± 4.04	23.01 ± 3.24	30.79 ± 5.00
Uric acid (mg/dl)	1.12 ± 0.18	2.04 ± 0.22	3.24 ± 0.43*** and #	2.73 ± 0.27*
Urea (mg/dl)	29.27 ± 4.27	31.16 ± 1.67	30.31 ± 2.56	28.48 ± 1.28
Triglycerides (mg/dl)	27.10 ± 2.08	31.52 ± 3.44	26.69 ± 2.00	44.53 ± 2.64***, ## and +++
ALT (U/L)	10.28 ± 1.62	25.34 ± 1.84	28.11 ± 4.67	39.37 ± 9.08**
AST (U/L)	58.58 ± 9.53	56.13 ± 6.42	52.25 ± 10.50	75.71 ± 14.49

Note: Data are present in mean ± standard error of mean (SEM). The markers *** and * mean different from Lean-C at $p < .005$ and $p < .05$, respectively, ## and # mean different from Obese-C at $p < .01$ and $p < .05$, and +++ means different from 50mg-BPO at $p < .005$. Alanine aminotransferase (ALT); aspartate aminotransferase (AST); crude buriti pulp oil (BPO).

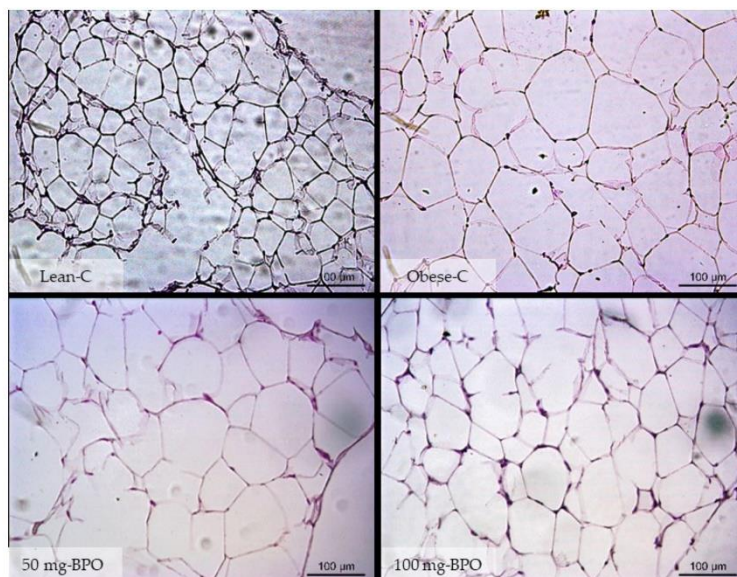


FIGURE 4 Histological analysis of the epididymal adipose tissue of each experimental group. Images are presented with 20x magnification. Bar scale: 100 µm. Crude buriti pulp oil (BPO)

TABLE 3 Adipocytes area in epididymal adipose tissue of the animals in each experimental group

Parameter	Lean-C	Obese-C	50mg-BPO	100mg-BPO
Adipocytes area (µm ²)	2,661.32 ± 48.9	8,357.05 ± 160.22*	8,043.62 ± 172.23*	6,961.82 ± 177.01*, ## and +

Note: The marker * means different from Lean-C at $p < .05$, ## different from Obese-C at $p < .01$ and + different from 50mg-BPO at $p < .05$. Crude buriti pulp oil (BPO).

3.3.2 | Renal tissue

In the analysis of renal tissue, we observed that the groups receiving a high-fat diet showed an increase in fat deposition (steatosis) in the

distal tubules of the deep and superficial cortical region. However, the only group that presented a statistical difference when compared to the Lean-C and other groups was the 100mg-BPO group (Figure 5 and Table 4).

FIGURE 5 Histological analysis of the renal tissue of each experimental group. Images are presented with 20x magnification. Bar scale: 100 μ m. CR = renal corpuscle. Crude buriti pulp oil (BPO)

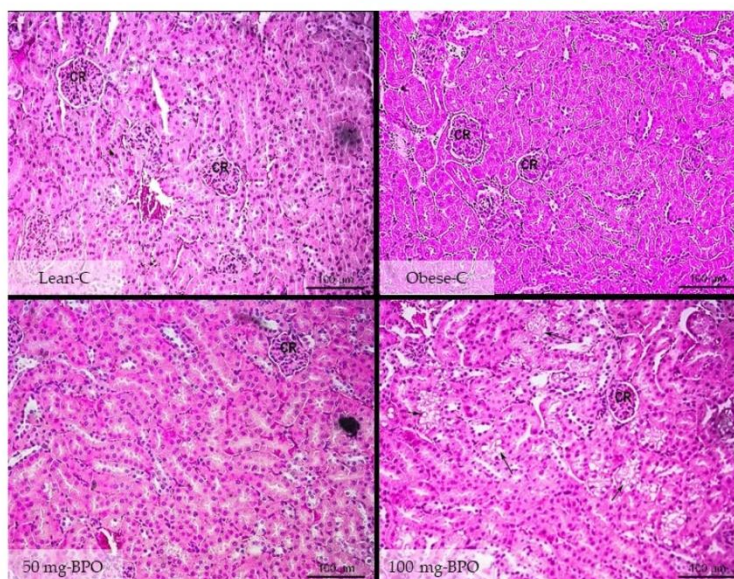


TABLE 4 Renal steatosis score

Score	Lean-C	Obese-C	50mg-BPO	100mg-BPO
2	100%	60%	75%	40%
4	0%	40%	25%	30%
6	0%	0%	0%	30%
Mean	2.00 \pm 0.00	2.80 \pm 0.33	2.50 \pm 0.26	4.22 \pm 0.52***, # and ++

Note: The 100mg-BPO presented more renal fatty accumulation than other experimental groups. Score 2 means the absence of lesions (fatty accumulation). Score 4 means the presence of minor injury. Score 6 means the presence of medium injury. Renal fatty accumulation was presented in 60% of the animals in the 100mg-BPO group. The markers *** mean different from Lean-C at $p < .005$, # different from Obese-C at $p < .05$ and ++ different from 50mg-BPO at $p < .01$. Crude buriti pulp oil (BPO).

3.3.3 | Hepatic tissue

Histological analysis of the liver showed that Obese-C and 100mg-BPO group presented mild, diffuse and macrovesicular steatosis with a higher concentration in zone 2 (intermediate zone). The 50mg-BPO group presented a moderate median for diffuse and macrovesicular steatosis, also predominant in zone 2. All groups receiving a high-fat diet were statistically different from the Lean-C group. There was no significant difference between the obese groups (Figure 6 and Table 5).

3.4 | TBARS and reduced glutathione

3.4.1 | Liver TBARS and reduced glutathione

Concerning lipidic damage, although the 50mg-BPO group showed a tendency towards higher TBARS, this was not statistically significant, so all groups presented the same amount of TBARS in the liver. Reduced GSH was depleted in high-fat groups, but there was no

difference between the Obese-C group and groups that received BPO (Figure 7).

3.4.2 | Adipose tissue TBARS and glutathione

There was no statistical difference in GSH and TBARS in high-fat groups. But, the Obese-C group presented higher GSH when compared with the Lean-C group, and the 50mg-BPO group showed more TBARS than the Lean-C group (Figure 8).

3.5 | Oral glucose tolerance test

Figure 9 shows the glycaemic curve of the groups. The glucose in the Lean-C group returned to basal levels after 30 min ($p = .1294$). After 15 min, the glucose of all obese groups rose to the same values; however, the Obese-C group returned to baseline after 30 min ($p = .9844$), and although the drop was not marked, the 100mg-BPO group also returned

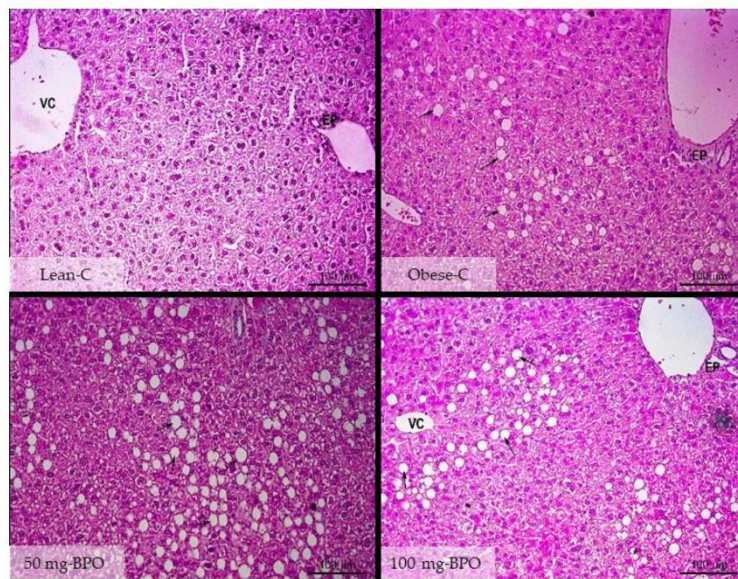


FIGURE 6 Histological analysis of the hepatic tissue of each experimental group. Images are presented with 20x magnification. Bar scale: 100 μ m. VC = centrilobular vein, EP = portal space. Black arrows indicate hepatic steatosis. Crude buriti pulp oil (BPO)

TABLE 5 Analysis of hepatic steatosis score in different treatments (median)

Parameter	Lean-C	Obese-C	50mg-BPO	100mg-BPO
Hepatic steatosis score	2	4*	6*	4*

Note: The marker * means different from Lean-C at $p < .05$. Score 2 means the absence of lesions (fatty accumulation), score 4 means the presence of minor injury, and score 6 means the presence of medium injury. Crude buriti pulp oil (BPO).

statistically to baseline after 30 min ($p = .1857$), while the 50mg-BPO group remained above baseline ($p = .0001$). Blood glucose in the 50mg-BPO group only returned to baseline values after 60 min ($p = .9996$), indicating that animals in this group had lower glucose tolerance.

4 | DISCUSSION

In this study, we administered to C57BL/6 mice a high-fat diet with 59,01% of calories from lipids, to induce obesity, and also a control oil or supplementation of BPO (an oil-rich in oleic acid, carotenoids and tocopherols) to test whether this food can attenuate the metabolic changes resulting from a high-fat diet.

The groups with a high-fat diet had the same feed intake, indicating that the BPO had no orexigenic effect or caused satiety in animals. Although the same consumption of ration in high-fat groups, when compared with the Obese-C group both groups that received BPO presented a worsening in metabolic risk factors associated with MetS, as discussed below.

One important risk factor associated with MetS is abdominal obesity. Also, waist circumference is correlated with visceral fat accumulation. In this experiment, animals in the groups that received BPO showed larger abdominal circumference when compared to the Obese-C group, besides that, retroperitoneal fat was higher in 50mg-BPO group in comparison with Obese-C group.

Another risk factor related to MetS is the presence of insulin resistance. In this sense, the 100mg-BPO group presented fasting glucose levels higher than the Obese-C group, and 50mg-BPO needs more time to return to basal glucose levels in OGTT when compared to other groups. These analyses indicate that groups that received BPO have less glucose tolerance than then Obese-C group.

Regarding hypertriglyceridaemia, 100mg-BPO was the only group that had a statistical difference when compared to the Lean-C group, presenting triglyceride levels 64,32% higher than the Lean-C group. This change can be explained when we analyse the histological changes in adipose tissue. The group that received 100 mg of BPO had smaller adipocytes than other groups that received the high-fat diet, showing that 100mg-BPO group had possibly a higher rate of lipolysis in adipose tissue. This scenario of triacylglycerols mobilization can be associated with more release in free fatty acids in the portal vein that can be directed to the liver or other organs (Bosy-Westphal et al., 2019; Rutkowski et al., 2015; Slawik & Vidal-Puig, 2006).

Corroborating this hypothesis, animals of the 100mg-BPO group had markedly more fat deposition in the kidney, being the only group with medium injury in the organ. Fatty accumulation in the kidney is a factor associated with an increased risk of chronic kidney disease and hypertension [29].

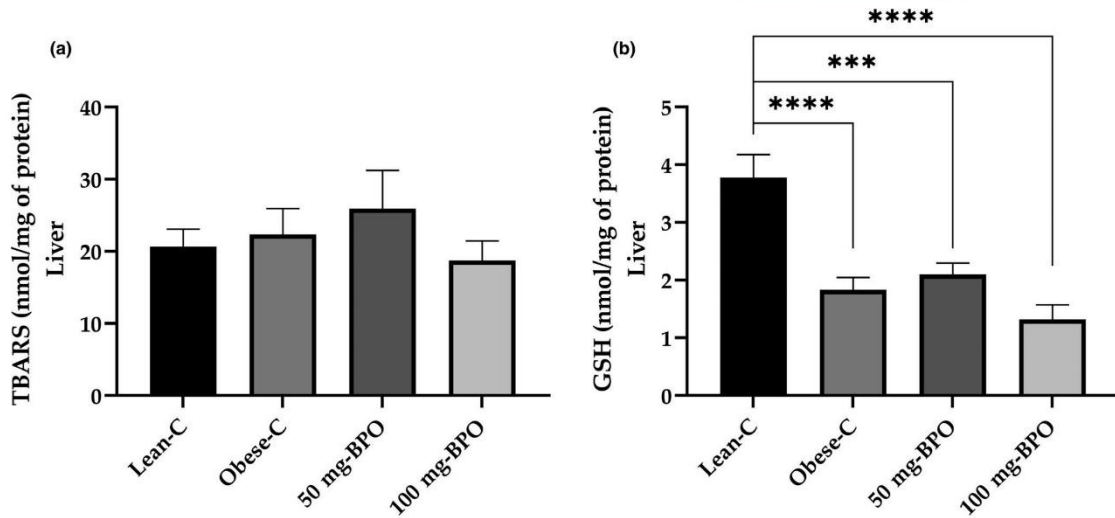


FIGURE 7 Liver TBARS and reduced glutathione. The markers **** and *** mean different from Lean-C at $p < .001$ and $p < .005$ respectively. Crude buriti pulp oil (BPO)

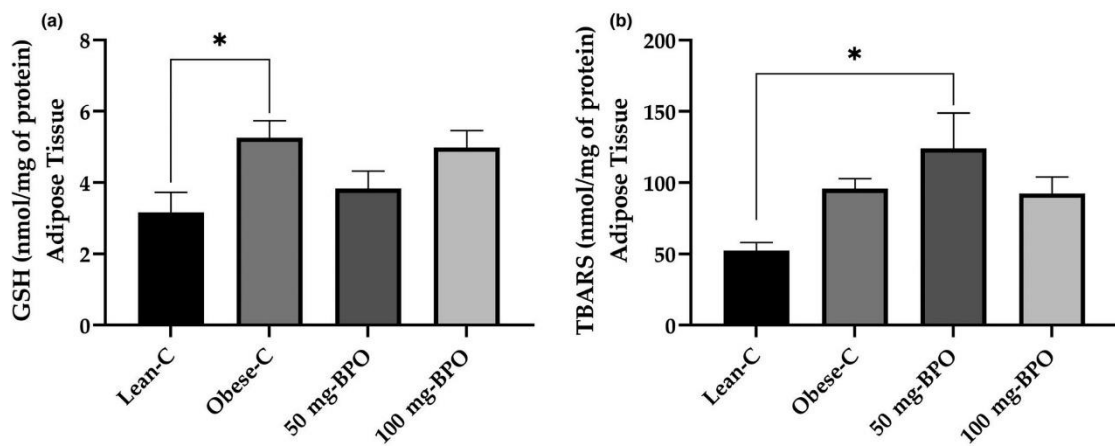


FIGURE 8 Adipose tissue TBARS and reduced glutathione. The marker * mean different from Lean-C at $p < .05$. Crude buriti pulp oil (BPO)

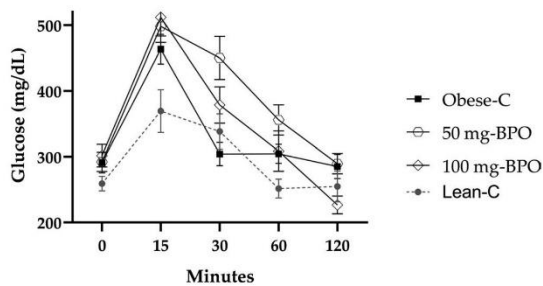


FIGURE 9 Oral glucose tolerance test. Crude buriti pulp oil (BPO)

Also, although the hypothesis that large adipocytes are correlated with a worse metabolic state is well established (Lane, 2013), some researches have failed to support this theory, in fact, in some cases, it has been observed that the presence of smaller adipocytes correlates with a worse metabolic state (Johannsen et al., 2014; Sierra et al., 2015).

Our results regarding blood glucose and serum triglycerides are similar to those found in another study. Alcada et al. (2017) found that C57BL/6 mice fed by a 45% fat diet for 14 weeks also did not entail a statistical difference in the levels of basal glycaemia and triglycerides when compared the lean control group with the high-fat control group; however, a high-fat diet in association with the

supplementation of vitamin E resulted in unbalanced glucose metabolism, causing hyperglycaemia and hypertriglyceridaemia (Alcala et al., 2017).

Concerning NAFLD, none of the animals in the Lean-C group had liver damage, whereas the animals in the groups with a high-fat diet had mild or moderate injuries. A total of 45.46% of the animals in the 50mg-BPO group had moderate steatosis (the most severe state presented in all groups), while only 20.00% of the animals in the Obese-C had this degree of steatosis, but these data showed no statistical difference. Therefore, we cannot say that BPO aggravated hepatic steatosis in the BPO supplemented groups, but it was certainly not beneficial.

Metabolic syndrome is also correlated with cardiovascular problems, and it is well described that the quantification of serum uric acid can be used as a biomarker to predict cardiovascular risk and metabolic syndrome (Silva et al., 2015; Thaslima Nandhini et al., 2018). Also, observational studies showed that serum uric acid is correlated with NAFLD, and it can be a predictive factor of NAFLD even when regressions are adjusted for age, gender and MetS (Xu et al., 2010), and when ALT levels are also high along with uric acid levels, the presence of NAFLD is even more likely (Zelber-Sagi et al., 2006).

In this sense, Obese-C group levels of uric acid did not differ from Lean-C, but the 100mg-BPO group showed higher values of uric acid when compared to the Lean-C group and the 50mg-BPO group showed higher values than the Lean-C group and the Obese-C group. So supplementation of BPO increased the levels of uric acid. The 100mg-BPO also was the only group that presented more ALT levels when compared with the Lean-C group, indicating possible damage in the liver associated with NAFLD.

So, supplementation of BPO increased the levels of biomarkers related to cardiovascular disease, NAFLD and MetS in BPO groups.

Although metabolic syndrome, obesity and NAFLD are correlated with increases in oxidative stress, researches have shown that antioxidants can have a deleterious effect on the prevention of obesity (Alcala et al., 2017; Peris et al., 2019). The reason for the worsening is not yet well established. For some authors, in some situations, a reduction in oxidative stress can also cause a reduction in the adaptive capacity of the organism, since previous exposure to oxidative damage—in small quantities—can increase the oxidative defence of the body by adapting the expression of antioxidant enzymes (Niki, 2016). It is also hypothesized that antioxidants can block ROS function as second messengers and may disrupt the differentiation of mesenchymal stem cells in preadipocytes and later in mature adipocytes (Kanda et al., 2011; Tormos et al., 2011).

It was found that the carotenoid Lycopene in lower doses did not attenuate alcohol-induced stress oxidative in Fischer 344 rats and can even aggravate alcohol-related changes when administrated in high doses (3.3 mg/kg BW⁻¹/d⁻¹) (Veeramachaneni et al., 2008). In women with a high risk of cardiovascular disease, vitamin E, vitamin C and β -carotene do not improve cardiovascular events (Cook et al., 2007). In a meta-analysis that includes only participants from developed countries (to avoid the bias of nutritionally deficient populations), vitamin E did not prove to reduce mortality, cardiovascular death or

cerebrovascular accident, and β -carotene, although in small proportion, significantly increased risk of death (Vivekananthan et al., 2003).

Therefore, although BPO has the potential to be a functional food (Neri-Numa et al., 2018), in the context of this study, it worsened the metabolic changes caused by weight gain. One of the factors that may have contributed to this result was the use of antioxidant compounds before the onset of obesity, as previously reported with vitamin E supplementation (Alcala et al., 2017), so to test this hypothesis we measured TBARS and reduced glutathione in the liver and adipose tissue.

Our results showed that the 50mg-BPO group was the only group with a statistical difference in TBARS when compared with the Lean-C group, also it has numerically lower levels of reduced glutathione in adipose tissue, indicating that this group had higher oxidative stress in this tissue and corroborating the hypothesis of the imbalance on redox state caused by the administration of antioxidants before the establishment of a large amount of oxidative stress. But, the 100mg-BPO did not show higher levels of TBARS or lower values of glutathione in the analysed organs.

Other researches also did not found beneficial effects of crude BPO supplementation. Crude BPO improves retinol deposition in the liver and serum of neonatal rats, however, delayed reflex maturation and negatively impacts somatic growth, when compared with animals fed with soya bean oil (Medeiros et al., 2015). In another experiment, crude BPO increased total cholesterol and LDL-cholesterol when compared with the control group that received soya bean oil (De Souza Aquino et al., 2015).

Buriti is a wide fruit consumed in Brazil, and although BPO had emerged as a potential functional food, due to its composition of fatty acids and vitamins, in our model and other experiments, crude BPO had negative health effects; however, studies are scarce, and there is a real need for more evidence to improve this claim. Therefore, it is still too early to make any kind of inference and more research with crude BPO and possible secondary compounds obtained in its extraction are necessary. We also encourage researchers to test whether crude or refined BPO can attenuate NAFLD after the onset of the disease.

5 | ANIMAL WELFARE STATEMENT

The experiment was approved and conducted with the consent of the Animal Use Ethics Commission from the Federal University of Mato Grosso do Sul (protocol n° 932/2018). The project, including plant and animal specimens used in the research, was registered at the Ministry of the Environment via SISGEN, in accordance with article 41 of Decree No. 8.772/2016, which regulates the registration of access to genetic heritage or associated traditional knowledge, with the code of register: AB4C726.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil,

Finance Code 001, the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).


ORCID

Leonardo Recena Aydos  <https://orcid.org/0000-0002-9883-5094>

Luane Aparecida do Amaral  <https://orcid.org/0000-0002-1448-2472>

Ana Cristina Jacobowski  <https://orcid.org/0000-0001-8233-0713>

Roberta Serafim de Souza  <https://orcid.org/0000-0003-2538-6707>

Eduardo Benedetti Parisotto  <https://orcid.org/0000-0001-5934-0323>


Mariana Biava de Menezes  <https://orcid.org/0000-0001-5871-5285>

Felipe Francisco Bittencourt Junior  <https://orcid.org/0000-0001-8801-9934>

Iandara Schettert Silva  <https://orcid.org/0000-0001-9431-098X>

Luciane Candeloro Portugal  <https://orcid.org/0000-0001-9619-0010>

Leandro Fontoura Cavalheiro  <https://orcid.org/0000-0002-9962-8521>

Carlos Eduardo Domingues Nazário  <https://orcid.org/0000-0001-5097-3298>

Elisvânia Freitas dos Santos  <https://orcid.org/0000-0002-1528-6035>

Maria Lígia Rodrigues Macedo  <https://orcid.org/0000-0002-6063-0763>

REFERENCES

- Albuquerque, M. L. S., Guedes, I., Alcantara, P., Moreira, S. G. C., Barbosa Neto, N. M., Correa, D. S., & Zilio, S. C. (2005). Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6 A), 1113–1117. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000700004>
- Alcala, M., Calderon-Dominguez, M., Serra, D., Herrero, L., Ramos, M. P., & Viana, M. (2017). Short-term vitamin E treatment impairs reactive oxygen species signaling required for adipose tissue expansion, resulting in fatty liver and insulin resistance in obese mice. *PLoS One*, 12(10), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186579>
- Aquino, J. D. S., Pessoa, D. C. N. D. P., Araújo, K. D. L. G. V., Epaminondas, P. S., Schuler, A. R. P., Souza, A. G. D., & Stamford, T. L. M. (2012). Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the Brazilian cerrado: Physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(2), 212–219. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000200004>
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., ..., McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(9–10), 525–534. <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>
- Besse-Patin, A., & Estall, J. L. (2014). An intimate relationship between ROS and insulin signalling: Implications for antioxidant treatment of fatty liver disease. *International Journal of Cell Biology*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/519153>
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B. M. (1963). Improved methods for determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory Clinics Medicine*, 61, 882–888.
- Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). [35] Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105, 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05038-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05038-2)
- Borrueal, S., Moltó, J. F., Alpañés, M., Fernández-Durán, E., Álvarez-Blasco, F., Luque-Ramírez, M., & Escobar-Morreale, H. F. (2014). Surrogate markers of visceral adiposity in young adults: waist circumference and body mass index are more accurate than waist hip ratio, model of adipose distribution and visceral adiposity index. *PLoS One*, 9(12), e114112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114112>
- Bosy-Westphal, A., Braun, W., Albrecht, V., & Müller, M. J. (2019). Determinants of ectopic liver fat in metabolic disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 209–214. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0323-7>
- Christensen, K., & Thomas Lawler, J. M. (2019). Dietary carotenoids and non-alcoholic fatty liver disease among US Adults, NHANES 2003–2014. *Nutrients*, 11(1102), 1–12.
- Cook, N. R., Albert, C. M., Gaziano, J. M., Zaharris, E., MacFadyen, J., Danielson, E., & Manson, J. A. E. (2007). A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: Results from the women's antioxidant cardiovascular study. *Archives of Internal Medicine*, 167(15), 1610–1618. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.15.1610>
- Cymerys, M., Fernandes, N. M. D. P., & Rigamonte-Azevedo, O. C. (2005). Buriti *Mauritia flexuosa* L.f. In *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica* (p. 300). Retrieved from <https://www.fca.unesp.br/Home/Extensao/GrupoTimbo/frutiferas.pdf>
- De Souza Aquino, J., Soares, J. K., Magnani, M., Stamford, T. C. M., De Jesus Mascarenhas, R., Tavares, R. L., & Stamford, T. L. M. (2015). Effects of dietary brazilian palm oil (*Mauritia flexuosa* L.) on cholesterol profile and vitamin A and E status of rats. *Molecules*, 20(5), 9054–9070. <https://doi.org/10.3390/molecules20059054>
- Engin, A. (2017). *Obesity and Lipotoxicity* (A. B. Engin & A. Engin, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5>
- FAO, OPS, WFP, UNICEF. (2019). *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe 2019*, (1–135). Santiago: FAO, OPS, WFP, UNICEF. <http://www.fao.org/3/ca6979es/ca6979es.pdf>
- Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., ..., Morales-González, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3117–3132. <https://doi.org/10.3390/ijms12053117>
- Ferramosca, A., Di Giacomo, M., & Zara, V. (2017). Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World Journal of Gastroenterology*, 23(23), 4146–4157. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i23.4146>
- Ferreira, E. L. (2008). *Palm trees of acre handbook, Brazil* (in Portuguese). Retrieved January 10, 2020, from https://www.nybg.org/bsci/acre/www1/manual_palmeiras.html
- Filho, A. B. G., & Lima, J. D. S. (2001). *O Buritizeiro (Mauritia flexuosa L.) e seu Potencial de Utilização*, 1, (Embrapa, Ed.). (1–21). Macapá: Embrapa Amapá. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/346837/o-buritizeiro-mauritia-flexuosa-l-e-seu-potencial-de-utilizacao>
- Furukawa, S., Matsuda, M., Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., & Iwaki, M. (2017). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome Find the latest version: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/JCI200421625.1752>
- García-Quiroz, A., Moreira, S. G. C., De Moraes, A. V., Silv, A. S., Da Rocha, G. N., & Alcantara, P. (2003). Physical and chemical analysis of dielectric properties and differential scanning calorimetry techniques

- on buriti oil. *Instrumentation Science and Technology*, 31(1), 93–101. <https://doi.org/10.1081/CI-120018411>
- Johannsen, D. L., Tchoukalova, Y., Tam, C. S., Covington, J. D., Xie, W., Schwarz, J.-M., ..., Ravussin, E. (2014). Effect of 8 weeks of over-feeding on ectopic fat deposition and insulin sensitivity: Testing the “adipose tissue expandability” hypothesis. *Diabetes Care*, 37(10), 2789–2797. <https://doi.org/10.2337/dc14-0761>
- Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S. W., & Watanabe, Y. (2011). Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, 89(7–8), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.007>
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Medicine*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-48>
- Lane, M. D. (2013). Adipogenesis. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (pp. 52–56). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00089-X>
- Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., ..., Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>
- Medeiros, M. C., Aquino, J. S., Soares, J., Figueiroa, E. B., Mesquita, H. M., Pessoa, D. C., & Stamford, T. M. (2015). Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 46(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.05.001>
- Neri-Numa, I. A., Soriano Sancho, R. A., Pereira, A. P. A., & Pastore, G. M. (2018). Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. *Food Research International*, 103, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.053>
- Niki, E. (2016). Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>
- Peris, E., Micallef, P., Paul, A., Palsdottir, V., Enejder, A., Bauzá-Thorbrügge, M., ..., Wernstedt Asterholm, I. (2019). Antioxidant treatment induces reductive stress associated with mitochondrial dysfunction in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 294(7), 2340–2352. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004253>
- Pokorska-Spiwak, M., Kowalik-Mikołajewska, B., Aniszewska, M., Pluta, M., & Marczyńska, M. (2017). Novel serum biomarkers modified by the body mass index z-score for the detection of liver fibrosis and steatosis in children with chronic hepatitis C. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2462-1>
- Priest, C., & Tontonoz, P. (2019). Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nature Metabolism*, 1(12), 1177–1188. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Rinella, M. E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review. *JAMA*, 313(22), 2263–2273. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>
- Rutkowski, J. M., Stern, J. H., & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *The Journal of Cell Biology*, 208(5), 501–512. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409063>
- Sierra, H., Cordova, M., Chen, C.-S.-J., & Rajadhyaksha, M. (2015). Confocal imaging-guided laser ablation of basal cell carcinomas: An ex vivo study. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(2), 612–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Silva, H. A. D., Carraro, J. C. C., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. M. (2015). Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. *Einstein (São Paulo)*, 13(2), 202–208. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015AO3194>
- Silva, S. M., Sampaio, K. A., Taham, T., Rocco, S. A., Ceriani, R., & Meirelles, A. J. A. (2009). Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon region. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 611–616. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1400-9>
- Slawik, M., & Vidal-Puig, A. J. (2006). Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Research Reviews*, 5(2), 144–164. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2006.03.004>
- Thaslima Nandhini, J. S., Savitha Basker, G., & Vishnupriya, V. (2018). Association between serum uric acid and metabolic syndrome. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(10), 400–402. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27233>
- Tormos, K. V., Anso, E., Hamañaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., & Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metabolism*, 14(4), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.007>
- Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Veeramachani, S., Ausman, L. M., Choi, S. W., Russell, R. M., & Wang, X.-D. (2008). High dose lycopene supplementation increases hepatic cytochrome P4502E1 protein and inflammation in alcohol-fed rats. *The Journal of Nutrition*, 138(7), 1329–1335. <https://doi.org/10.1093/jn/138.7.1329>
- Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., Hsu, A., & Topol, E. J. (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease. *Obstetrics & Gynecology*, 102(5 Part 1), 1086. <https://doi.org/10.1097/00006250-200311000-00039>
- Wang, L., Ding, C., Zeng, F., & Zhu, H. (2019). Low levels of serum β -carotene and β -carotene/retinol ratio are associated with histological severity in nonalcoholic fatty liver disease patients. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 156–164. <https://doi.org/10.1159/000496458>
- WHO. (2019). Global Health Observatory (GHO) data. Retrieved from https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/
- Xiao, M.-L., Chen, G.-D., Zeng, F.-F., Qiu, R., Shi, W.-Q., Lin, J.-S., ..., Chen, Y.-M. (2019). Higher serum carotenoids associated with improvement of non-alcoholic fatty liver disease in adults: A prospective study. *European Journal of Nutrition*, 58(2), 721–730. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1678-1>
- Xu, C., Yu, C., Xu, L., Miao, M., & Li, Y. (2010). High serum uric acid increases the risk for nonalcoholic fatty liver disease: A prospective observational study. *PLoS One*, 5(7), e11578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011578>
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Halpern, Z., & Oren, R. (2006). Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver International*, 26(7), 856–863. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01311.x>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Recena Aydos L, Aparecida do Amaral L, Cristina Jacobowski A, et al. Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in c57bl/6 mice. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2020;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/jpn.13473>

SUPPLEMENTAL TABLE 1 Crude buriti pulp oil fatty acid profile (mean \pm standard deviation)

Fatty acid	Crude buriti pulp oil (% of total fatty acids)
Lauric Acid Methyl Ester	0.13 \pm 0.00
Myristic Acid Methyl Ester	0.09 \pm 0.00
Pentadecanoic Acid Methyl Ester	0.03 \pm 0.00
Palmitic Acid Methyl Ester	18.37 \pm 0.04
Palmitoleic Acid Methyl Ester	0.10 \pm 0.00
Heptadecanoic Acid Methyl Ester	0.09 \pm 0.00
Stearic Acid Methyl Ester	1.84 \pm 0.01
Elaidic Acid Methyl Ester	0.03 \pm 0.00
Oleic acid methyl ester	76.45 \pm 0.04
Linoleic Acid Methyl Ester	1.11 \pm 0.00
Eicosenoic Acid Methyl Ester	0.09 \pm 0.00
Cis-11-Eicosenoic Acid Methyl Ester	0.47 \pm 0.00
Lignoceric Acid Methyl Ester	0.02 \pm 0.00
Saturated	20.66
Monounsaturated	77.05
Polyunsaturated	1.11
Non identified	1.18
Total	100.00

APÊNDICE 4 – DIETA UTILIZADA NO EXPERIMENTO

Os animais do grupo “dieta padrão” foram alimentados de acordo com as diretrizes apresentadas pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93M). Para a dieta hiperlipídica foi realizada alteração na dieta AIN-93M, substituindo parte do amido de milho por lipídeos, conforme proposto por Lenquiste *et al.* (2015) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Composição das dietas que foram utilizadas no experimento

Ingredientes	Quantidade de gramas/kg	
	Dieta Padrão (AIN-93M)	Dieta Hiperlipídica
Amido de milho	465,692	265,692
Caseína (≥ 85% proteína)	140	140
Banha de porco	-	200
Amido de milho dextrinizado (90,94% de tetrassacarídeos)	155	155
Sacarose	100	100
Óleo de soja (sem aditivos)	40	40
Fibra	50	50
Mix de minerais (AIN-93MMX)	35	35
Mix de vitaminas (AIN-93-VX)	10	10
L-Cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina (41,1% colina) ¹	2,5	2,5
Terc-butil-hidroquinona	0,008	0,008

¹ - Baseado no peso molecular da base livre.

Fonte: Baseado em (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993); LENQUISTE *et al.* (2015).

REFERÊNCIAS

LENQUISTE, Sabrina Alves et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, [s.l.], v. 77, p.162-170, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.023>.

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY, George C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 123, n. 11, p.1939-1951, 1 nov. 1993. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>.

ANEXO 1. CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO

Certificado referente ao artigo de revisão intitulado “Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models” (Anexo 2), publicado na revista *Nutrients*.



ANEXO 2. CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO

Screenshot da página online do indexador Pubmed da *National Library of Medicine*, referente ao artigo de resultados intitulado “Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in c57bl/6 mice” (Anexo 3), publicado na revista *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Wiley - Online ISSN:1439-0396), fator de impacto 1,597, Qualis Capes A2 (2019).



> *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020 Nov 23. doi: 10.1111/jpn.13473. Online ahead of print.

Buriti pulp oil did not improve high-fat diet-induced metabolic disorders in c57bl/6 mice

Leonardo Recena Aydos^{1 2 3}, Luane Aparecida do Amaral^{1 3}, Ana Cristina Jacobowski^{2 4}, Roberta Serafim de Souza^{1 2 3}, Eduardo Benedetti Parisotto⁴, Mariana Biava de Menezes⁴, Felipe Francisco Bittencourt Junior^{5 6}, Emely Schuindt Fernandes^{5 6}, Iandara Schettert Silva^{3 7}, Luciane Candeloro Portugal⁸, Cláudio Gonçalves Oliveira⁸, Gustavo Tsuyoshi Senra Masuko³, Leandro Fontoura Cavalheiro⁹, Carlos Eduardo Domingues Nazário⁹, Elisvânia Freitas Dos Santos⁴, Maria Lúgia Rodrigues Macedo^{2 4}

Affiliations + expand

PMID: 33226712 DOI: 10.1111/jpn.13473

[Full-text links](#)

[Cite](#)

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) and obesity are growing in many parts of the world, becoming public health problems. It is proposed that foods with functional properties can assist in the treatment of these diseases. Crude buriti pulp oil (BPO) is a food traditionally consumed by residents in the Pantanal, Cerrado and Brazilian Amazon. It is rich in oleic acid, tocopherols and carotenoids, emerging as a potential functional food. Thus, this study aimed to evaluate the effect of the supplementation of BPO on metabolic disorders caused by a high-fat diet. Four groups of C57BL6 mice were used, a lean group with AIN-93M diet and control oil supplementation, an obese group with a high-fat diet and control oil supplementation, and two obese groups with a high-fat diet and BPO supplementation in the amounts of 50 and 100 mg/kg. BPO worsened the metabolic state caused by the high-fat diet, worsening risk factors associated with MetS, as the abdominal circumference and retroperitoneal fat, serum levels of total cholesterol, uric acid, alanine transaminase, glucose and triglycerides, and renal fat, in addition to changes in glycaemic control and oxidative stress markers. C57BL/6 mice fed with a high-fat diet and supplemented with BPO presented a worsening in metabolic risk factors associated with MetS.

Keywords: high-fat diet; metabolic syndrome; obesity.

© 2020 Wiley-VCH GmbH.

ANEXO 3. CADASTRO SISGEN

Certidão de cadastro no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SISGEN)



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AB4C726

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AB4C726**
Usuário: **UFMS**
CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Mus musculus

Bactris setosa

Mauritia flexuosa

Acrocomia totai

Attalea phalerata

Inga laurina

Título da Atividade: **Frutos do cerrado e pantanal: Propriedades físico-químicas e seus efeitos em modelo experimental**

Equipe

MARIA LIGIA RODRIGUES MACEDO	UFMS
Elisvânia Freitas dos Santos	UFMS
Leonardo Recena Aydos	UFMS
Luane Aparecida do Amaral	UFMS
Suzy Wider Machado	UFMS
Iandara Schettert Silva	UFMS
Roberta Serafim de Souza	UFMS
Fabiane La Flor Ziegler Sanches	UFMS

Data do Cadastro: **16/08/2018 22:59:41**

Situação do Cadastro: **Concluído**

ANEXO 4. REGISTRO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Alimentos do cerrado: nutrigenômica e marcadores fisiológicos relacionados à obesidade", registrada com o nº 932/2018, sob a responsabilidade de **Maria Ligia Rodrigues Macedo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 2ª reunião ordinária do dia 21/03/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/04/2017 a 04/03/2021
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / C57BL/6
Nº de animais	48
Peso/Idade	21 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 22 de março de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATESTADO DE SANIDADE

Atesto que estão sendo fornecidos pelo Biotério Central-UT/Inbio, nesta data, 48 exemplares de *Rattus norvegicus* da linhagem WISTAR, machos de 40 dias, para a pesquisadora Maria Ligia Rodrigues Macedo.

Todos os animais examinados são provenientes de colônias convencionais, com controle sanitário estabelecido e encontram-se em perfeitas condições de saúde, não apresentando clinicamente doença infectocontagiosa ou parasitária.

Projeto: Propriedades Neuroprotetoras da Acrocomia aculeata em mamíferos.

Protocolo CEUA 1008/2018

Campo Grande, 15 de março de 2019

Maria Paula Ferreira Fialho Frazillo
Responsável Técnica pelo Biot.UT/Inbio
CRMV-MS 3004

Biotério Central - UT / Inbio
Avenida Senador Fillinto Muller 1555, Vila Ipiranga Fone: 067 3345-3540 / 3345- 3642
CEP 79074-460 Campo Grande (MS)
e-mail: bioterio.inbio@ufms.br