

Dieta Rica em Banha e Colesterol, mas não Dieta Rica em Banha, Leva a Distúrbios Metabólicos em um Modelo Modificado de Dislipidemia

High-Lard and High-Cholesterol Diet, but not High-Lard Diet, Leads to Metabolic Disorders in a Modified Dyslipidemia Model

Lidiane B. Muniz, Aline M. Alves-Santos, Fabricio Camargo, Danieli Brolo Martins, Mara Rubia N. Celes,^{1B} Maria Margareth V. Naves^{1B}

Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO – Brasil

Resumo

Fundamento: Tendo em vista o aumento da prevalência global de doenças cardiovasculares e hepáticas, o conteúdo lipídico da dieta e sua relação com o acúmulo de gordura nos hepatócitos têm sido investigados como fatores-chave na prevenção dessas doenças.

Objetivo: Avaliar os efeitos metabólicos de uma dieta rica em banha suplementada com colesterol ou não, em um modelo modificado de dislipidemia.

Métodos: Foram divididos 24 ratos Wistar machos adultos em três grupos: dieta padrão (DP - 4% de lipídios), dieta rica em banha (DRB - 21% de banha) e dieta rica em banha e colesterol (DRB/RC - 20% de banha, 1% de colesterol e 0,1% de ácido cólico). Após seis semanas de tratamento, o sangue e o fígado foram coletados para análises bioquímicas (perfil lipídico sérico e enzimas hepáticas) e morfológicas. A análise estatística incluiu análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações de médias. Uma probabilidade de 5% foi considerada estatisticamente significativa.

Resultados: Animais alimentados com DRB/RC apresentaram um aumento nos níveis séricos de colesterol total, triacilglicerol, LDL-c, não-HDL-c, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em comparação com aqueles alimentados com DP. Além disso, os animais tratados com DRB/RC apresentaram um peso relativo do fígado maior, com esteatose hepática macrovesicular moderada e infiltrado inflamatório.

Conclusão: Uma dieta rica em gordura com banha (20%) e colesterol (1%) desencadeou dislipidemia com danos graves ao fígado em ratos em um tempo experimental menor do que os modelos previamente relatados. A dieta rica em banha sem suplementação de colesterol levou ao ganho de peso corporal, mas não à dislipidemia. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):896-902)

Palavras-chave: Gorduras da dieta; Colesterol; Metabolismo lipídico; Fígado Gorduroso; Inflamação; Ratos.

Abstract

Background: In view of the increased global prevalence of cardiovascular and hepatic diseases, the diet lipid content and its relationship with the accumulation of fat in hepatocytes have been investigated as key factors in preventing these diseases.

Objective: To evaluate the metabolic effects of a high-lard diet supplemented or not with cholesterol on a modified dyslipidemia model.

Methods: We divided 24 adult male Wistar rats into three groups: standard diet (STD - 4% lipids), high-lard diet (HLD - 21% lard), and high-lard and high-cholesterol diet (HL/HCD - 20% lard, 1% cholesterol, 0.1% cholic acid). After six weeks of treatment, blood and liver were collected for biochemical (serum lipid profile and liver enzymes) and morphological analyses. Statistical analysis included one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test for mean comparisons, and a 5% probability was considered statistically significant.

Results: Animals fed HL/HCD showed increased total cholesterol, triacylglycerol, LDL-c, non-HDL-c, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) serum levels compared to those fed STD. In addition, the HL/HCD animals presented higher relative liver weight, with moderate macrovesicular hepatic steatosis and inflammatory infiltrate.

Conclusion: A high-fat diet with lard (20%) and cholesterol (1%) triggered dyslipidemia with severe liver damage in rats in a shorter experimental time than the previously reported models. The high-lard diet without supplementation of cholesterol led to body weight gain, but not to dyslipidemia. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):896-902)

Keywords: Dietary Fats; Cholesterol; Lipid Metabolism; Fatty Liver; Inflammation; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Maria Margareth V. Naves •

Universidade Federal de Goiás - Faculdade de Nutrição - Laboratório de Nutrição Experimental - Rua 227, quadra 68, Setor Leste Universitário, CEP 74605-080, Goiânia, GO - Brasil

E-mail: mmvnaves@gmail.com

Artigo recebido em 27/08/2018, revisado em 03/12/2018, aceito em 23/01/2019

DOI: 10.5935/abc.20190149

Introdução

A prevalência mundial de doenças metabólicas e complicações de saúde associadas aumentou nas últimas décadas. Excesso de gordura corporal, resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e dislipidemia levam a distúrbios metabólicos relacionados ao maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares.¹ A DHGNA varia desde um pequeno acúmulo de gordura no hepatócito até estágios mais graves de necrose inflamatória, com ou sem fibrose. Estudos indicam uma associação entre DHGNA e resistência à insulina, inflamação de hepatócitos e comprometimento do metabolismo lipídico,^{2,3} já que a maioria dos pacientes com DHGNA apresenta dislipidemia.⁴

A dislipidemia é caracterizada por níveis aumentados de triacilglicerol (TG) e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), e diminuição do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c).⁵ Hipercolesterolemia (aumento isolado do LDL-c) e hipertrigliceridemia (aumento isolado do TG) são as formas mais comuns de dislipidemia.⁶ Em geral, o desequilíbrio do metabolismo lipídico resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, como hábitos alimentares, especialmente o consumo de lipídios. Portanto, o conteúdo lipídico da dieta tem sido investigado como um fator chave na prevenção de doenças cardiovasculares e hepáticas.⁷

Estudos experimentais com dietas hiperlipídicas usaram teores muito altos de gordura dietética (cerca de 50% da composição da dieta), em protocolos de curto período (quatro semanas), sem constatar um comprometimento lipídico sérico.^{8,9} Por outro lado, estudos testando concentrações lipídicas mais próximas do consumo humano têm sido realizados durante um período experimental relativamente longo, como em relatos anteriores com ratos (21% de gordura por 9 semanas)¹⁰ e com camundongos (15% a 20% de gordura durante 12 a 16 semanas).^{11,12}

Nesse contexto, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos metabólicos de uma dieta rica em banha suplementada com colesterol ou não, num modelo modificado de dislipidemia, com tempo de experimentação e concentração lipídica da dieta menores em relação aos relatos anteriores.

Métodos

Animais, dietas e desenho experimental

O experimento foi conduzido com ratos Wistar machos adultos fornecidos pela Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brasil). Os ratos foram mantidos em gaiolas plásticas (2 animais/gaiola) por sete semanas (uma semana de aclimação e seis semanas de ensaio), sob condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$). No experimento, dividimos aleatoriamente 24 ratos em 3 grupos de 8 animais, de acordo com um delineamento de blocos casualizados, com base no peso corporal. O tamanho da amostra foi definido com base em estudos prévios sobre dislipidemia experimental. Cada grupo recebeu uma das seguintes dietas: dieta padrão (DP; RH19521, Rhoster, Brasil) preparada de acordo com

AIN-93M,¹³ uma dieta rica em banha (DRB; RH195143, Rhoster, Brasil), e dieta rica em banha e colesterol (DRB/RC; RH195142, Rhoster, Brasil). Óleo de soja e banha foram utilizados como fontes lipídicas; colesterol, para induzir hipercolesterolemia; e ácido cólico, para aumentar o efeito hipercolesterolemico do colesterol suplementado¹⁴ (Tabela 1). As dietas e água filtrada foram fornecidas *ad libitum*. A ingestão dietética e o peso corporal dos animais foram monitorados três vezes por semana.

Após seis semanas de experimentação, os animais foram eutanasiados (xilazina + cetamina /10 mg/kg + 100 mg/kg). Em seguida, coletamos amostras de sangue por punção abdominal (cerca de 5 mL) para análises bioquímicas (perfil lipídico sérico e enzimas hepáticas). Após a eutanásia por exsanguinação da aorta abdominal, extraímos, pesamos e preparamos o fígado dos animais para avaliação morfológica. Todos os procedimentos estavam de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório¹⁵ e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (protocolo número 039/15).

Análises bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas em tubos de heparina e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 min para separar o soro, que foi imediatamente armazenado a -80°C para as análises de perfil lipídico e enzimas hepáticas. Os níveis de colesterol total (CT), TG, LDL-c, HDL-c, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinados por kits comercialmente disponíveis (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). O colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) foi estimado pela equação de Friedewald. A fração não-HDL-c foi obtida pela diferença entre os níveis de CT e HDL-c. A importância da fração não-HDL-c tem sido destacada na predição do risco de doença cardiovascular. Boekholdt et al.¹⁶ revelaram que as concentrações de não-HDL-c tiveram uma associação direta mais forte com o risco de DCV que o LDL-c e a apolipoproteína B (Apo B).

Avaliação morfológica do fígado

Os lóbulos do fígado foram lavados em solução fisiológica gelada a 0,9% e fixados por imersão em formalina a 10% tamponada com fosfato por 24 h. Posteriormente, os lobos foram cortados em fragmentos de 4 a 5 mm de espessura, desidratados em concentrações crescentes de álcool (80%, 95% e 100%), clarificados em xilol (3 banhos de 30 min cada) e embebidos em parafina. Secções seriadas de $5 \mu\text{m}$ de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Usamos as secções coradas com HE para analisar as alterações no arranjo do parênquima hepático e a presença de infiltrados inflamatórios com um Leica Las V4 Software (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Reino Unido), um microscópio Leica DM2000 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Suíça), uma câmera de vídeo Leica DC230 (Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador com internet. Vinte campos de parênquima hepático de cada animal foram selecionados aleatoriamente e analisados, com aumentos de 100x e 400x.

Análise estatística

Dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A literatura considera o peso corporal e parâmetros bioquímicos obtidos em modelos animais como dados paramétricos.⁸⁻¹² Assim, determinamos a significância estatística usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparações das médias ($p < 0,05$). O software STATISTICA, versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado para análises estatísticas.

Resultados

A banha utilizada na formulação das dietas continha 39 g/100 g de gordura saturada e 72 mg/100 g de colesterol. Nas dietas ricas em gordura (DRB e DRB/RC), a banha contribuiu com aproximadamente 15 mg de colesterol/100 g de dieta, além do colesterol adicionado à DRB/RC. Quarenta e quatro por cento (44%) da energia da DRB e DRB/RC derivaram de lipídios, um valor quatro vezes maior que o da DP (11%).

O peso corporal inicial dos animais não diferiu entre os grupos, o que garantiu a homogeneidade das repetições do grupo. Os animais alimentados com DRB apresentaram maior ganho de peso corporal do que os do grupo DP. O peso do fígado e o peso relativo do fígado dos animais alimentados com DRB/RC foram maiores ($p < 0,05$) que os dos demais grupos (Tabela 2).

Animais alimentados com DRB/RC apresentaram maiores níveis séricos de CT, TG, LDL-c, VLDL-c, não-HDL-c, ALT e AST

do que aqueles tratados com DP e com DRB. O perfil lipídico sérico e as enzimas hepáticas de animais alimentados com a DRB não foram diferentes daqueles do grupo DP (Tabela 2).

Alterações microscópicas foram encontradas no fígado dos animais alimentados com DRB/RC (Figura 1), pois a arquitetura do tecido hepático não estava preservada, com balonamento dos hepatócitos (caracterizado por inchaço e/ou vacuolização), alterações nos capilares sanguíneos sinusoidais e hiperemia passiva (capilares e veias ingurgitadas com sangue). Além disso, ratos alimentados com DRB/RC apresentaram esteatose hepática macrovesicular moderada, associada a uma infiltração acentuada por células linfomononucleares. Por outro lado, animais alimentados com DRB tiveram sua arquitetura de tecido hepático preservada, com hepatócitos de aspecto morfológico normal, e distribuição vascular, veia centrolobular e tríade portal preservadas. Ainda o grupo tratado com DRB mostrou esteatose hepática microvesicular leve, associada a menor infiltração por células linfomononucleares. A arquitetura do tecido hepático do grupo tratado com DP foi mantida com hepatócitos típicos, sinusóides hepáticos preservados e cadeias capilares; distribuição vascular conservada, tríades portais intactas, com ramos da veia porta, artéria hepática e ducto biliar.

Discussão

A dislipidemia foi desencadeada em ratos alimentados com uma dieta com 20% de banha e 1% de colesterol, em seis semanas, com aumento do peso do fígado, lesão hepática e infiltrado inflamatório.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

Componente (g/100g de dieta)	Dieta ¹		
	DP	DRB	DRB/RC
Caseína (82,93 g de proteína)	16,47	16,47	16,47
L-cistina	0,18	0,18	0,18
Óleo de soja	4,00	0,00	0,00
Banha ²	0,00	21,00	20,00
Colesterol ²	0,00	0,00	1,00
Ácido cólico ²	0,00	0,00	0,10
Sacarose	10,00	10,00	10,00
Celulose	5,00	5,00	5,00
Mistura de minerais	3,50	3,50	3,50
Bitartrato de colina	0,25	0,25	0,25
Mistura de vitaminas	1,00	1,00	1,00
tert-Butilhidroquinona (TBHQ)	0,008	0,008	0,008
Amido de milho dextrinizado	15,50	15,50	15,50
Amido de milho	14,09	27,09	26,99
Lipídios (g/100g) ³	4,1 \pm 0,1	19,7 \pm 1,4	20,8 \pm 1,6
Energia dos lipídios ⁴	36	189	189
Energia da dieta (kcal/g) ⁴	3,41	4,26	4,26
(Energia dos lipídios x 100)/energia da dieta (%)	11	44	44

¹Reeves et al.¹³; DP: dieta padrão; DRB: dieta rica em banha; DRB/RC: dieta rica em banha e colesterol; ²Fernandes et al.¹⁰; ³Resultado da análise química da dieta;

⁴Valor energético da dieta: 4, 4 e 9 kcal/g para proteína, carboidrato e lipídio, respectivamente.

Tabela 2 – Peso corporal e do fígado e parâmetros bioquímicos de ratos Wistar após seis semanas de tratamento com dietas padrão e hiperlipídicas

Parâmetro	Dieta		
	DP	DRB	DRB/RC
Peso corporal (g)			
Inicial	249,05 ± 21,44 ^a	243,85 ± 15,09 ^a	242,35 ± 16,78 ^a
Final	499,58 ± 65,32 ^a	564,08 ± 39,73 ^a	508,58 ± 47,68 ^a
Ganho	250,53 ± 48,40 ^b	320,23 ± 44,50 ^a	266,23 ± 38,21 ^{a,b}
Fígado			
Peso (g)	14,90 ± 2,33 ^b	15,92 ± 1,65 ^b	27,10 ± 5,94 ^a
Peso relativo (g/100g de peso corporal)	2,98 ± 0,24 ^b	2,82 ± 0,14 ^b	5,28 ± 0,80 ^a
Perfil lipídico sérico (mg/dL)			
CT	59,83 ± 15,99 ^b	64,58 ± 14,13 ^b	87,75 ± 8,54 ^a
LDL-c	4,23 ± 0,71 ^b	6,98 ± 2,09 ^b	23,63 ± 4,55 ^a
HDL-c	30,74 ± 4,11 ^a	34,42 ± 7,77 ^a	26,74 ± 4,23 ^a
não-HDL-c	29,09 ± 12,13 ^b	30,17 ± 10,84 ^b	61,01 ± 6,95 ^a
VLDL-c	10,68 ± 1,58 ^b	16,77 ± 4,58 ^{a,b}	18,52 ± 7,51 ^a
TG	53,42 ± 7,91 ^b	83,83 ± 22,90 ^{a,b}	92,58 ± 37,55 ^a
Enzimas hepáticas (U/L)			
ALT	48,72 ± 15,91 ^b	28,16 ± 6,00 ^b	210,30 ± 137,78 ^a
AST	154,67 ± 22,42 ^b	117,00 ± 29,84 ^b	300,63 ± 60,26 ^a

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. a, bValores na mesma linha com letras sobrescritos diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p < 0,05$). DP: dieta padrão; DRB: dieta rica em banha; DRB/RC: dieta rica em banha e colesterol; Peso relativo do fígado = (peso do fígado / peso corporal) x 100; CT: colesterol total; LDL-c: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol de lipoproteína de alta densidade; VLDL-c: colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa; TG: triacilglicerol; não-HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

No presente estudo, os lipídios contribuíram com 44% da energia da dieta rica em gordura, um percentual próximo ao relatado para dieta hiperlipídica consumida por indivíduos com sobrepeso ou obesos (43% a 55%).¹⁷⁻¹⁹ Em estudos prévios com animais, a contribuição lipídica variou de 67% a 75% da energia da dieta rica em gordura.^{8,9} Portanto, estas dietas com alto teor de lipídios não reproduzem, realisticamente, as dietas ricas em gordura consumidas pelos seres humanos. A recomendação diária para adultos humanos é de 20% a 35% de energia a partir de lipídeos, de acordo com o AMDR (*Acceptable Macronutrient Distribution Ranges*), considerando que a alta ingestão lipídica indica um maior risco de obesidade e distúrbios associados.²⁰

O maior ganho de peso corporal no grupo DRB pode ser explicado pelo maior consumo de dieta (17,6 g/dia/rato) em relação ao grupo DRB/RC (13,8 g/dia/rato), pois a densidade energética das dietas foi semelhante (4,26 kcal/g). Um maior ganho de peso foi relatado em estudo anterior com ratos alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol (densidade energética = 4,27 kcal/g) por 12 semanas, em comparação ao grupo controle.¹²

Apesar do maior ganho de peso corporal, o grupo DRB não diferiu do grupo DP em relação ao peso do fígado (Tabela 2). O peso relativo do fígado no grupo DRB/RC foi muito elevado, representando mais de 5% do peso corporal destes animais. O aumento do peso do fígado no grupo DRB/RC está relacionado à forte presença de vesículas de gordura nos

hepatócitos, como observado na avaliação morfológica do fígado (Figura 1). Um estudo anterior com ratos em uma dieta rica em gordura e colesterol, sem ácido cólico, por 16 semanas apresentou resultados semelhantes em relação ao peso do fígado e acúmulo de lipídios no tecido hepático.¹¹ Em nosso estudo, o ácido cólico provavelmente acelerou os efeitos dislipidêmicos do colesterol no grupo DRB/RC, uma vez que identificamos distúrbios metabólicos em apenas 6 semanas, enquanto o estudo de Jung et al.¹¹ alcançou os mesmos efeitos em 16 semanas. O comprometimento lipídico sérico observado em animais alimentados com DRB/RC é característico de dislipidemia, e o aumento acentuado do LDL-c pode estar relacionado à redução na atividade do receptor de LDL-c nos hepatócitos. Estudos prévios revelaram mudanças nos níveis séricos de CT e TG de ratos e camundongos alimentados com dieta em gordura e rica em colesterol.^{10,12} No entanto, os períodos de experimentação dos estudos relatados (9 e 12 semanas, respectivamente) foram maiores do que o usado no presente estudo.

O perfil lipídico sérico dos animais alimentados com DRB não diferiu daqueles alimentados com DP. Estudos com ratos Wistar tratados com dietas contendo 50% a 55% de banha (67% a 75% da energia da dieta) por quatro semanas mostraram resultados semelhantes.^{8,9} O efeito deletério do consumo muito alto de ácidos graxos saturados e sua relação com a dislipidemia têm sido questionados.¹ Siri et al.²¹ destacaram que os efeitos da gordura saturada no perfil lipídico sérico poderiam ser modulados pelo conteúdo e/ou disponibilidade de ácidos graxos

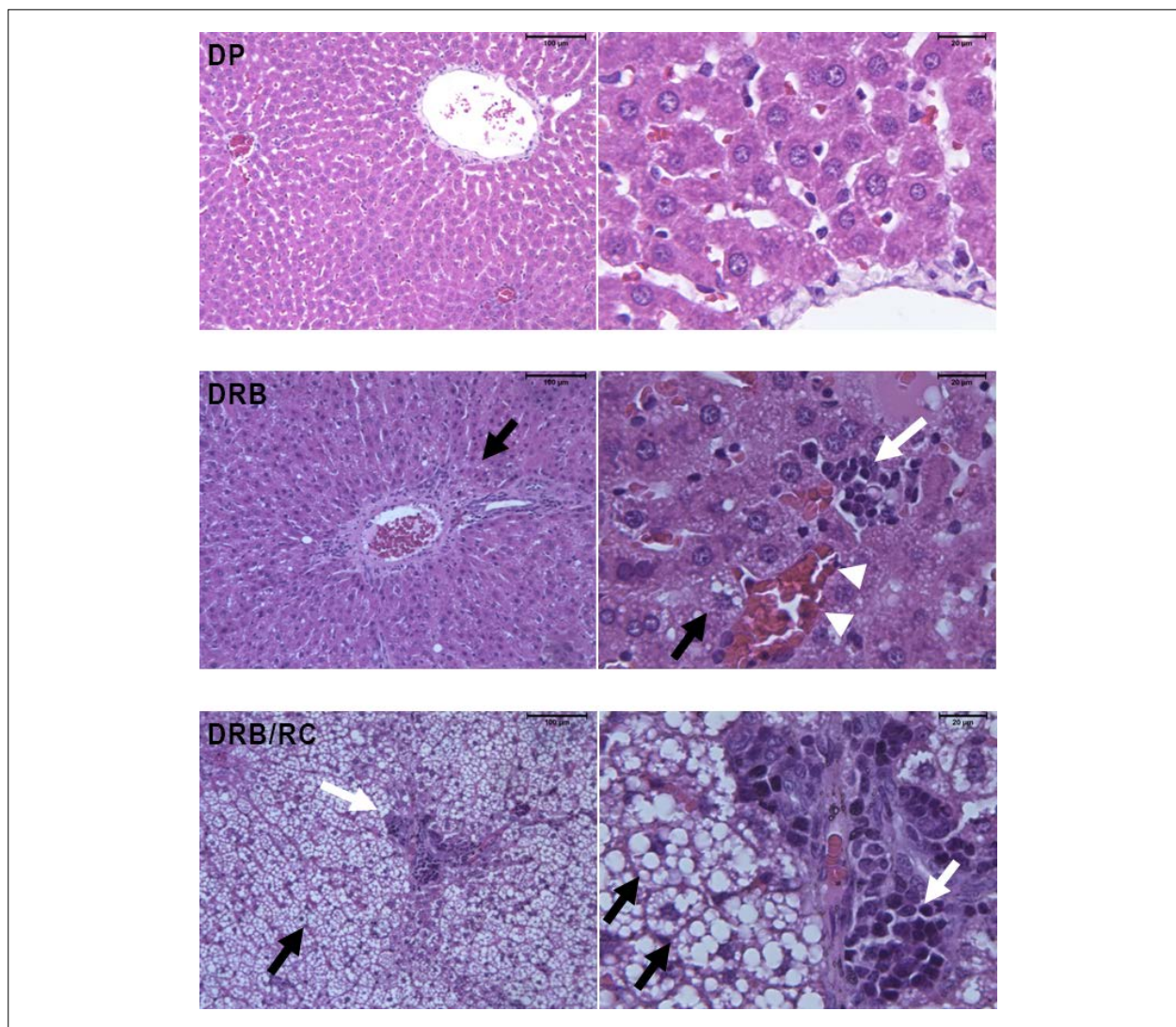


Figura 1 – Avaliação morfológica do fígado de ratos Wistar alimentados com dietas hiperlipídicas por seis semanas. DP (dieta padrão): arquitetura preservada do tecido hepático com distribuição vascular conservada. DRB (dieta rica em banha): arquitetura de tecido hepático preservada com esteatose hepática leve e uniforme (setas pretas), infiltrado inflamatório leve (setas brancas) e hiperemia passiva leve (cabeças de setas). DRB/RC (dieta rica em banha e colesterol): arquitetura tecidual alterada com esteatose hepática moderada, microvesículas e macrovesículas de gordura (setas pretas) e infiltrado inflamatório acentuado (setas brancas). As barras indicam 100 μ m a uma ampliação de 100x (painel esquerdo) e 20 μ m a uma ampliação de 400x (painel direito).

polinsaturados, de modo que a gordura saturada aumentaria apenas o LDL-c se a ingestão de gordura polinsaturada estivesse abaixo de um nível limiar (5% da energia da dieta).²² Nossos resultados confirmaram que a ingestão excessiva de ácidos graxos saturados explica apenas parte das alterações no perfil lipídico sérico. Outros fatores influenciam essas alterações, como colesterol na dieta, obesidade, resistência à insulina e hipertrigliceridemia.^{23,24}

Altos níveis séricos de ALT e AST são característicos da DHGNA e estão associados à resistência à insulina. Neste estudo, os níveis séricos aumentados de ALT e AST foram compatíveis com os danos hepáticos observados nos animais alimentados com a DRB/RC. Outros estudos também encontraram aumento dos níveis séricos de ALT e AST em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol.^{11,12}

A avaliação morfológica mostrou alterações marcantes no tecido hepático de animais alimentados com DRB/RC, como macrovesículas gordurosas e infiltrados inflamatórios, caracterizando uma esteatose hepática moderada,²⁵ que foi confirmada pelos resultados das enzimas hepáticas (ALT e AST). O acúmulo de gordura no fígado desses animais está relacionado ao alto consumo de colesterol, pois essa sobrecarga nas células altera a homeostase do colesterol.²⁶ Além disso, o acúmulo de metabólitos lipídicos intermediários, como diacilglicerol e acilcarnitinas, está associado à inflamação e resistência à insulina.^{27,28} Um estudo anterior sugeriu que o colesterol elevado na dieta é um fator crítico para a progressão da esteatose hepática e da inflamação em modelos animais. No entanto, características da DHGNA são mais evidentes quando o colesterol suplementado é associado ao ácido cólico em uma dieta rica em gordura, como observado em nosso estudo.

A presença de infiltrado inflamatório no tecido hepático promove a secreção de citocinas e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), que induzem a resistência à insulina. Neste distúrbio metabólico, a lipólise aumentada de TG armazenada no tecido adiposo eleva a produção de ácidos graxos. Os ácidos graxos liberados na circulação, por sua vez, inibem a ação anti-lipolítica da insulina e promovem maior absorção lipídica pelo fígado, levando à dislipidemia e à esteatose hepática.^{3,32,33} Hamsters alimentados com dieta hiperlipidêmica contendo colesterol (0,2%), por 10 semanas, desenvolveram dislipidemia e esteatose hepática, com concentrações séricas aumentadas de CT, TG, LDL-c, ALT e AST.³⁴ Análise histopatológica do fígado de ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em colesterol (1,5%) também revelou esteatose hepática e inflamação.³⁵

Uma limitação do nosso estudo foi a impossibilidade de usar métodos mais precisos para avaliar macro- e micro-vesículas de gordura hepática e células espumosas, como Oil Red e imuno-histoquímica, respectivamente, o que poderia nos permitir analisar quantitativamente os danos hepáticos. Além disso, recomendamos estudos adicionais, incluindo um tratamento com banha e ácido cólico, para investigar se o ácido cólico pode aumentar os efeitos metabólicos do colesterol presente na banha.

Conclusão

Uma dieta rica em gordura com banha (20%) e colesterol (1%) desencadeou dislipidemia com danos graves ao fígado de ratos, em um tempo experimental menor do que os modelos previamente relatados. A dieta rica em banha sem suplementação de colesterol levou ao ganho de peso corporal, mas não à dislipidemia. Este modelo pode ser útil para investigar distúrbios metabólicos em diferentes delineamentos experimentais relacionados à dislipidemia e suas comorbidades.

Referências

1. Ruiz-Núñez B, Dijk-Brouwer DA, Muskiet FA. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 2016 Oct;36:1-20.
2. Green CJ, Hodson L. The influence of dietary fat on liver fat accumulation. *Nutrients.* 2014;6(11):5018-33.
3. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: interplay between diet, gut microbiota, and genetic background. *Gastroenterol Res Pract.* 2016 May;2016:1-13.
4. Zhang QQ, Lu LG. Nonalcoholic fatty liver disease: dyslipidemia, risk for cardiovascular complications, and treatment strategy. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(1):78-84.
5. Katsiki N, Mikhailidis DP, Mantzoros CS. Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: an update. *Metabolism.* 2016;65(8):1109-23.
6. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients.* 2013;5(5):1544-60.
7. Marais AD. Dietary lipid modification for mild and severe dyslipidemia. *Proc Nutr Soc.* 2013;72(3):337-41.
8. Leonardi-Carvalho DS, Zucoloto S, Ovidio PP, Heidor R, Ong TP, Moreno FS, et al. Metabolic differences in the steatosis induced by a high-fat diet and high-protein-fat diet in rats. *Advances in Biochemistry.* 2015;3(6):86-95.
9. Picchi MC, Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini MA, Portari GV, et al. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cir Bras.* 2011;26(Suppl 2):25-30.
10. Fernandes DC, Alves AM, Castro CSF, Jordão Júnior AA, Naves MMV. Effects of baru almond and Brazil nut against hyperlipidemia and oxidative stress in vivo. *J Food Res.* 2015;4(4):38-46.
11. Jung UJ, Cho YY, Choi MS. Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients.* 2016;8(5):305.
12. Zidani S, Benakmoum A, Ammouche A, Benali Y, Bouhadeff A, Abbeduto S. Effect of dry tomato peel supplementation on glucose tolerance, insulin resistance, and hepatic markers in mice fed high-saturated-fat/high-cholesterol diets. *J Nutr Biochem.* 2017 Feb;40:164-71.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa de estudo, e à professora Maria Aderuza Horst, Ph.D., pela assistência nos procedimentos com animais.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Obtenção de financiamento: Naves MMV; Obtenção de dados: Muniz LB, Alves-Santos AM, Camargo F, Martins DB, Celes MRN; Análise e interpretação dos dados, Análise estatística e Redação do manuscrito: Muniz LB, Alves-Santos AM; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Martins DB, Celes MRN, Naves MMV.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPEG.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte do projeto de Pós-doutorado de Lidiane B. Muniz, realizado na Universidade Federal de Goiás.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Goiás, sob o número de protocolo 039/15.

13. Reeves PG, Nielsen FN, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
14. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(19):2300-9.
15. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animal, Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
16. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *JAMA* 2012;307(12):1302e9.
17. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB, Schaart G, Mensink RP, Schrauwen P. Three weeks on a high-fat diet increases intrahepatic lipid accumulation and decreases metabolic flexibility in healthy overweight men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(4):E691-5.
18. von Frankenberg AD, Marina A, Song X, Callahan HS, Kratz M, Utschneider KM. A high-fat, high-saturated fat diet decreases insulin sensitivity without changing intra-abdominal fat in weight-stable overweight and obese adults. *Eur J Nutr.* 2017;56(1):431-43.
19. Utschneider KM, Bayer-Carter JL, Arbuckle MD, Tidwell JM, Richards TL, Craft S. Beneficial effect of a weight-stable, low-fat/low-saturated fat/low-glycaemic index diet to reduce liver fat in older subjects. *Br J Nutr.* 2013;109(6):1096-104.
20. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids, Washington, DC: The National Academies Press, 2005.
21. Zárate A, Manuel-Apolinar L, Saucedo R, Hernández-Valencia M, Basurto L. Hypercholesterolemia as a risk factor for cardiovascular disease: current controversial therapeutic management. *Arch Med Res.* 2016;47(7):491-5.
22. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(3):502-9.
23. Kuipers RS, Graaf DJ, Luxwolda MF, Muskiet MH, Dijck-Brouwer DA, Muskiet FA. Saturated fat, carbohydrates and cardiovascular disease. *Neth J Med.* 2011;69(9):372-8.
24. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(3):535-46.
25. Vetelainen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg.* 2007;245(1):44-50.
26. Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res.* 2013;52(1):175-91.
27. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology.* 2014;59(2):713-23.
28. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2014;510(7503):84-91.
29. Lau JK, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol.* 2017;241(1):36-44.
30. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 2007;46(5):1392-403.
31. Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278(44):42774-784.
32. Asrih M, Jornayvaz FR. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: the good and the bad. *Clin Nutr.* 2014;33(2):186-190.
33. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016;65(8):1062-79.
34. Cui CX, Deng JN, Yan L, Liu YY, Fan JY, Um HN, et al. Silibinin capsules improves high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in hamsters through modifying hepatic de novo lipogenesis and fatty acid oxidation. *J Ethnopharmacol.* 2017 Aug;208:24-35.
35. Hu X, Wang T, Liang S, Li W, Wu X, Jin F. Antibiotic-induced imbalances in gut microbiota aggravates cholesterol accumulation and liver injuries in rats fed a high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(21):9111-22.

