



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA PASCUOTTE CÂNDIDO

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE ARROZ NO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NO FÍGADO DE RATOS
WISTAR.**

CAMPINAS
2016

JULIANA PASCUOTTE CÂNDIDO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE ARROZ NO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NO FÍGADO DE RATOS
WISTAR.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Biologia Funcional e Molecular, na área de
Bioquímica.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JULIANA PASCUOTTE CÂNDIDO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. DENISE VAZ DE
MACEDO.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. DENISE VAZ DE MACEDO

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, Não se aplica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C161e Cândido, Juliana Pascuotte, 1986-
Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar e no fígado de ratos Wistar / Juliana Pascuotte Cândido. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Denise Vaz de Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Óleo de farelo de arroz. 2. Suplementação alimentar. 3. Fígado. 4. Ácidos graxos. 5. Estresse oxidativo. I. Macedo, Denise Vaz de, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of rice bran oil supplementation on feeding behavior and in the liver of Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Rice bran oil

Supplementary feeding

Liver

Fatty acids

Oxidative stress

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Denise Vaz de Macedo [Orientador]

Dennys Esper Côrrea Cintra

Marília Cerqueira Leite Seelaender

Data de defesa: 25-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Prof. Dr. Dennys Esper Côrrea Cintra

Profa. Dra. Marilia Cerqueira Leite Seelaender

Profa. Dra. Daisy Machado

Profa. Dra. Helena Cristina de Lima Barbosa Sampaio

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Quando eu estava tentando elaborar a mecânica quântica, a experiência deu-me a oportunidade de aprender um fato notável: que uma nova realidade científica não triunfa por convencer seus opositores, fazendo-os ver a luz, senão que, muito antes, por que eventualmente seus opositores morrem e surge uma outra geração que se acha familiarizada com aquela”.

Max Plank

AGRADECIMENTOS

Desde os meus 8 ou 9 anos, eu adorava brincar de escolinha no quintal de casa. Me lembro, que ora eu ia a lousa e ensinava meus alunos imaginários, ora sentava nas cadeiras e escutava o som da minha própria voz ensinando e passando as tarefas a serem feitas.

O tempo passou e hoje depois muito tempo de estudo e dedicação, estou prestes a realizar meu sonho e deixar pra trás a voz dos alunos imaginários.

E é nesse momento que me passa a mente as primeira pessoas que me apoiaram e apostaram na realização desse meu sonho. Aqueles que geraram minha vida e me ensinam na prática o sentido das palavras ética, princípio e determinação. Sempre me ensinando a pescar e nunca me dando o peixe, foi assim que cresci e aprendi. Pai , mãe, muito obrigada por cuidarem de mim, me apoiarem e suprirem todas as minhas necessidades em todos os meus passos em busca desse sonho. E é claro, também agradeço a meu irmão, pessoa que transborda bondade, meu eterno companheiro e continente de todos os meus medos e inseguranças.

E quando olho para esses 3 anos de mestrado, penso em quantas experiências vivenciei, quantas qualidade constatei e como minha mente deu um salto por conviver com os pessoas tão brilhantes. Pessoas que me deixaram interagir com sua verdadeira essência e contribuíram para meu crescimento. Que sorte grande eu tive em conviver com vocês.

A começar por quem me levou a descobrir esse parque de diversões, o “transportador” mais corneteiro, de bem com a vida e esfomeado que conheço. Vuvu (Fernando Catanho), muito obrigada por me contagiar com sua alegria incessante, Fé e disposição em ajudar “*everyday*” .

Nesse parque, onde a diversão é desvendar as curiosidades com muita serenidade, para que a sociedade possa usufruir das informações, a essência da organização, dedicação, cuidado com o próximo e serenidade da Fernanda Lorenzi Lazarim, me guiaram nos primeiros passos dessa minha jornada.

E nesses primeiros passos, também tive um parceiro de trabalho que compartilhei horas de bancada e em vários outros experimentos. Um crítico nato, com essência de cientista, que me inspirou e inspira com seus questionamentos, sinceridade, disponibilidade em me ajudar e sempre, sempre surpreender, o Kell.

Também tive uma parceira com diferença significativa de bom senso, criatividade e que me contagia com seu amplo acervo léxico. Júlia, vivenciar essa sua essência, acompanhada de uma boa dose de indignação na vida, deixaram meus dias muito mais inquietantes e alegres.

Enquanto com uns eu aprendo e sinto a essência durante horas do dia, com outros, como Rubens (Rodrigo Ferrarresso) o meu tradutor particular e motivador de ideias malucas, aprendo através de vários conselhos e na prática a viver o lado bom e tranquilo da vida. Como me organizar para aposentar aos 40 anos e ter mais tempo com os amigos.

E falando em prática, como não citar a memória do Bernardo? Ele que cita a frase o autor, a revista, ano e o paragrafo de todos os artigos possíveis e imaginários. E sempre lembra de histórias reais ou frases dos seus heróis e seriados de infância, que nos servem de exemplos e muitas risadas.

Nesse tempo que passou, também aprendi na prática como o tempo é relativo. Horas de filosofia e conversas sobre as questões dos seres humanos passaram no relógio e apenas segundos, no tempo e espaço das conversas que tive com o Lucião no bandeirão.

E depois de tanto tempo, ainda posso sentir o cheirinho do café, ouvir as atrapalhadas e presenciar como se fosse hoje, a bondade da Flaviane. Quantas qualidades e experiências vivências para apenas um lugar, não é mesmo?

Isso porque, ainda nem falei do perfeccionismo e semelhanças que só os 15 de setembro entendem, não é mesmo Danilão? Ou, o verdadeiro sentido da Fé que o Léo demonstra, as viagens bioquímicas com o Pedro Kinase, e a motivação, carinho, ouvidos atentos e determinação que a Carol Normand me mostra com sua essência “literalmente” perfumada toda vez que saio do bandeirão.

Ou ainda, que pude conhecer um gênio, dotado de muita generosidade, que surpreende a todos com a naturalidade com que nos ensina diariamente o que é ciência. Meu co-orientador de coração, o professor René.

E como não falar daquela que proporcionou e cultivou esse ambiente tão incrível? Aquela que acredita e catalisa nossa energia potencial de forma tão genial. Que nos motiva e encanta toda vez que pega um giz e vai até a lousa e que me mostrou paciência, sabedoria e tranquilidade quando eu mais precisava. Professora Denise, sua essência pedagógica ficará pra sempre guardada em minha memória de forma intocavelmente bela e peculiar.

A forma como a senhora se preocupa incessantemente conosco, seus alunos, e a firmeza e criatividade com que elabora e defende o processo ensino-aprendizagem, só me faz querer aprender mais e ser uma profissional melhor a cada dia.

Também agradeço pela troca de experiências e críticas construtivas que recebi dos membros das bancas de qualificação e defesa. Troca e críticas que me fez sentir a importância de conhecer outras essências fora do nosso convívio.

E as minhas amigas-irmãs, que me motivaram desde o primeiro dia que pensei em dar o passo para a realização desse sonho. E que são sinônimo de segurança e conforto emocional, do qual não consigo me imaginar distante.

Então, muito do salto que minha mente deu e está simbolizada nesse trabalho, foram graças a essência de todos vocês. Todos, compartilharei aquilo que os tornam humanos e que me fazem querer ser uma pessoa e profissional melhor a cada dia. Todos que citei e ainda os que convivi menos e não citei, deixaram um pouco de si comigo e consequentemente nesse trabalho.

Então pra todos vocês, deixo aqui minha imensa gratidão registrada!

E por ultimo, porém não menos importante, agradeço a vida de todos os animais que participaram desse projeto. Sem eles, nada disso seria possível!

RESUMO

O óleo de arroz contém altos teores de ácidos graxos monoinsaturados (40%) e poli-insaturados (36,3%), além de grandes quantidades de antioxidantes (3 a 5% de gama-oryzanol e tocoferóis) quando comparado com outros óleos. Ácidos graxos mono e poli-insaturados podem apresentar efeito na saciedade alimentar e inibição da síntese de ácidos graxos no tecido adiposo e fígado. Enquanto os antioxidantes podem contribuir para a prevenção do ataque oxidativo de Espécies Reativas de Oxigênio. Além disso, propõe-se que o gama-oryzanol é uma molécula bioativa que também pode sinalizar o aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina e testosterona. Por outro lado, altas concentrações de ácidos graxos também podem gerar obesidade e doenças hepáticas não alcoólicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes dosagens de óleo de arroz no comportamento alimentar, composição corporal, parâmetros bioquímicos, histológicos e de estresse oxidativo no fígado de ratos da linhagem Wistar. Quarenta ratos machos foram divididos em 4 grupos: Suplementados com 1mL de óleo de arroz, correspondente a dosagem mínima (GMin); suplementados com 2mL de óleo de arroz, correspondente a dosagem média (GMed) e suplementados com 6mL, correspondente a dosagem máxima de óleo de arroz (GMax). O grupo controle recebeu volume fixo de 2 mL de água (GCon). Todos os grupos foram suplementados por gavagem durante 8 semanas (5 dias de suplementação seguido de dois dias de descanso). Avaliamos o consumo de ração e composição corporal após a primeira, quarta e oitava semana de suplementação. Ao final do protocolo foram também avaliadas as concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, glicose, colesterol total, triglicérides, HDL-Colesterol, uréia e das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e amilase pancreática. Também realizamos análise histológica e quantificamos o nível de peroxidação lipídica através do método TBARs e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GR no fígado dos animais. Nossos resultados mostraram que a suplementação com óleo de arroz induziu aumento na saciedade, redução da massa corporal total e aumento nas concentrações séricas de HDL-Colesterol, principalmente nas dosagens maiores do óleo (GMax). Por outro lado, houve aumento dos estoques de tecido adiposo ao redor de órgãos intra-abdominais, como a gordura periepididimal, aumento das concentrações de leptina sérica em todos os grupos suplementados e aumento nos níveis de estresse oxidativo associado ao dano hepático no GMed e GMax. Provavelmente a diminuição no consumo de ração foi devido a um aporte maior de lipídeos do óleo de arroz na composição da dieta, associado a uma diminuição nas quantidades de carboidratos e proteínas que, de forma crônica gera saciedade, mas contribui também para a diminuição da massa isenta de gordura, a explicação mais provável para a diminuição na massa corporal total dos animais suplementados. Esses dados sugerem cautela com o uso crônico de óleo de arroz.

Palavras chave: Óleo de Arroz, Suplementação, Fígado, Ácidos Graxos e Estresse Oxidativo

ABSTRACT

The rice bran oil contains high levels of mono (40%) and polyunsaturated (36,3%) fatty acids, and a large concentration of antioxidants (3 to 5% of gamma oryzanol and tocopherols) when compared to other vegetable oils. Mono and polyunsaturated fatty acids may have effect on food satiety and inhibition of the synthesis of fatty acids in adipose tissue and liver. While antioxidants, can contribute to the prevention of oxidative attack of reactive oxygen species. Furthermore, the gamma-oryzanol is a bioactive molecule that may signal the increase of plasma concentrations of adiponectin and testosterone. However, high concentrations of fatty acids can also generate obesity and non-alcoholic liver diseases. Our goal was to analyze the effects of different doses of rice bran oil in feeding behavior, body composition, biochemical, histological parameters and oxidative stress in liver of Wistar rats. Forty (40) Wistars male rats were divided into 4 groups: Supplemented with 1mL of rice bran oil, as minimum dose (GMin); supplemented with 2mL, as mean dose (GMed) and supplemented with 6 mL, as the highest dosage (GMax). The control group received fixed volume of 2 mL of water (GCon); All groups were supplemented by gavage during 8 weeks (5 days of supplementation following 2 days of rest). We analyzed food intake and body composition after the first, fourth and eighth weeks of supplementation. At the end of protocol we also analyzed the serum concentrations of leptin, adiponectina, glucose, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, urea and enzymes aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and amylase pancreatic. We also performed histological analysis and we measured the level of lipid peroxidation through TBARs method and the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GR in the liver of animals. Our results showed that supplementation with rice oil induced an increase in satiety, reduced total body mass and increased the serum HDL-cholesterol, especially in oil higher doses group (GMax). On the other hand, there was an increase of adipose tissue storage around the abdominal organs, such as the periepididymal fat associated with increased serum leptin in all supplemented groups, and elevated levels of oxidative stress associated with liver damage in GMed and GMax. Probably, the decrease in feed intake was due to a higher amount of rice oil lipids in the diet composition, associated with a decrease in the amounts of carbohydrates and protein that chronically produces satiety, but also contributes to the decrease in mass fat-free, the most likely explanation for the decrease in total body mass of the animals fed. Overall our data suggest caution with the chronic use of rice bran oil.

Key words: Rice bran oil, Supplementation, Liver, Fatty acids and Oxidative Stress

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\bullet\text{O}_2^-$	Radical anión superóxido
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxila
ALT	Alanina Transaminase
AST	Aspartato Transaminase
CAT	Catalase
CV	Coeficiente de variação
DTNB	Ácido 5,5 ditiobinitrobenzóico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCon	Grupo Controle
GMax	Grupo dosagem máxima
GMed	Grupo dosagem mediana
GMin	Grupo dosagem mínima
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H.E	Hematoxilina e Eosina
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-COA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
I.C	Intervalo de Confiança
$K_{ma=}$	Fator de área de superfície do animal
$K_{mh=}$	Fator de área de superfície do humano
LDL	Lipotroteina de baixa densidade
IL-6	Interleucina 6
MDA,	Malondialdeído
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OEA	Oleoletanolamina
PMSF	Fluoreto de FenilMetilsulfonila
PPAR α	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
QM	Quilomícron
QMr	Quilomícron remanescente
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TEP	Tetraetoxipropano
TGA	Triacilglicerol/Triglicérides
TNB	5,5'-Tiobis ácido 2-nitrobenzóico
TNF α	Fator de necrose tumoral α
SOD	Superóxido dismutase
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDLr	Lipoproteína de densidade muito baixa remanescente
XOD	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Origem dos óleos vegetais como recurso terapêutico	13
1.2. Óleo de arroz	15
1.3. Óleos e gorduras	19
1.3.1. Estrutura e função dos ácidos graxos	19
1.3.2. Absorção	21
1.3.3. Transporte dos lipídeos da dieta para os tecidos extra-hepáticos	23
1.4. Tecido adiposo	24
1.5. Fígado	26
1.5.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e células do fígado	28
1.5.2. Sistema de defesa antioxidante	30
1.5.3. Estresse oxidativo	31
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Animais	33
3.2. Protocolo de suplementação com Óleo de Arroz	34
3.2.1. Dosagem Equivalente para Humanos	35
3.3. Avaliação "in vitro" da presença de antioxidantes no óleo de arroz	36
3.4. Eutanásia, coleta de sangue e de tecidos	37
3.5. Parâmetros bioquímicos	38
3.6. Parâmetros hepáticos	38
3.6.1. Análises histológicas	38
3.6.2. Preparação das amostras de fígado para as análises da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, GR, SOD) e produtos de peroxidação lipídica (TBARs)	39
3.6.3. Análise da Peroxidação Lipídica através da análise de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	39
3.6.4. Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	40
3.6.5. Análise da atividade da enzima Catalase (CAT)	40
3.6.6. Análise da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR)	41
3.7. Análise estatística e apresentação dos resultados	41
4. RESULTADOS	43
4.1. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar	43
4.1.1. Consumo de ração	43
4.1.2. Ganho de massa	44
4.1.3. Percentual de macronutrientes consumidos da dieta padrão	45
4.1.4. Parâmetros hormonais	46
4.1.5. Parâmetros bioquímicos	47
4.2. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no fígado dos animais	47
4.2.1. Histologia	47
4.2.2. Marcadores de estresse oxidativo	49
4.2.3. Marcadores de função hepática	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar	51
5.2. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no fígado	53
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7. APLICAÇÕES PRÁTICAS	58

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO I	65
Avaliação “in vitro” da capacidade antioxidante do óleo de arroz.	65
ANEXO II	66
Padronizações, análise de confiança e descrição dos métodos experimentais....	66
A.I. Espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARs).....	67
A.II. Catalase	68
A.III. Glutathione Redutase.....	69
A.IV. Superóxido Dismutase.....	70
A.V. Cálculo da atividade enzimática.	71
ANEXO III	72
ANEXO IV.....	73

1. INTRODUÇÃO

Por mais de um milhão de anos nossos ancestrais percorriam diariamente quilômetros em busca de água e alimentos para manutenção das funções vitais do organismo e sobrevivência. Estima-se que a fonte de energia nessa época era 65% advinda de frutas, vegetais, nozes e mel. E apenas 35% era derivada de aves, peixes, mariscos e ovos. Com o advento da revolução agrícola e industrial esse comportamento mudou, ou seja, diminuiu a necessidade de busca e seleção dos alimentos que o ambiente ofertava naturalmente em função do cultivo de frutas, domesticação e produção em grande escala de animais para consumo alimentar e de novos alimentos como os cereais e alimentos processados (Eaton Cordain, 1997).

A redução da atividade física diária associada ao aumento do consumo de novos alimentos com alta densidade calórica, como fonte principal de energia, não correspondem com a maquinaria que desenvolvemos ao longo de milhões de anos. Estima-se que nos últimos 10.000 anos diminutos 0,005% dos nossos genes sofreram mutações espontâneas (Simopoulos, 2001). Assim, o estilo de vida moderno da população ocidental pode ser o potencial causador de doenças crônicas, como aterosclerose, obesidade, diabetes e doenças hepáticas.

1.1. Origem dos óleos vegetais como recurso terapêutico.

A utilização de óleos em geral como recurso terapêutico é de cultura milenar. Entretanto, os primeiros relatos científicos datam no final do século XIX, com a proposição da ingestão de óleo de fígado de bacalhau para pessoas com reumatismo crônico (Bradshaw, 1845) e óleo de oliva para pacientes com cálculos biliares (Goodhart, 1892).

Há relatos que os primeiros óleos de fígado de bacalhau foram adquiridos através da decomposição de peixes em barris de madeira. Porém, com o desenvolvimento tecnológico da agricultura moderna, com ênfase em grãos e vegetais, tornou-se possível a produção de óleos vegetais em grande escala para o consumo em saladas, para cozinhar alimentos e para aumentar a densidade calórica e sabor dos alimentos processados (Simopoulos, 2001).

Coincidência ou não, os índices na taxa de mortalidade por doenças cardíacas no início do século XX foram crescentes e alarmantes em alguns países, como EUA e Austrália. Nessa época, essas ocorrências despertaram o interesse da comunidade científica e as primeiras investigações epidemiológicas associaram o aumento das concentrações plasmáticas do colesterol com doenças coronarianas (Konstantinov et al., 2006). Assim, na década de 50 iniciaram as pesquisas para tratamento e prevenção do aumento das concentrações plasmáticas de colesterol (Tyroler, 2000).

Um dos estudos pioneiros que investigou a associação de óleos vegetais no tratamento de doenças cardíacas foi feito com a inserção de diferentes óleos vegetais (caroço do algodão, soja, milho, amendoim e cártamo) na dieta de mais de 50 pacientes coronarianos (Kinsell et al., 1958a). Nesse estudo observou-se que os óleos com maior quantidade de ácidos graxos do tipo linoleico (18:2) apresentaram redução das concentrações plasmáticas de colesterol, seguido de nenhuma oclusão coronariana durante os 3 anos consecutivos que compreenderam o estudo.

A partir desse, vários outros estudos investigaram os mecanismos de ação pelos quais a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados podem contribuir em doenças e na redução das concentrações plasmáticas de colesterol. Nesse contexto na década de 70, pesquisadores relataram que ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido linoleico, ofertados através do óleo de cártamo e de milho eram mais eficazes na diminuição dos níveis de ácidos graxos hepáticos quando comparados com os ácidos graxos saturados do óleo de coco e monoinsaturados sintético (Sabine et al., 1969), devido a inibição da atividade das enzimas da síntese de ácidos graxos *in vitro* (Bortz et al., 1963) e *in vivo* (Flick et al., 1977).

Nessa época começaram a surgir na literatura investigações dos efeitos dos ácidos graxos no tecido adiposo. Um dos primeiros estudos nesse sentido mostrou que os ácidos graxos poli-insaturados comparado com ácidos graxos saturados eram mais eficazes na inibição da atividade das enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos, como a acetil-CoA carboxilase (Bortz et al., 1963) e ácido graxo sintetase (Foufelle et al., 1992). E esse efeito se refletia no menor ganho de massa total e de massa adiposa (Raclot e Oudart, 1999; Fickoca et al., 1998).

Um fato importante a ser considerado nos trabalhos com óleos vegetais é que com exceção de poucos estudos que utilizaram animais saudáveis (Campanella et al., 2014; Eder et al., 2006; Poudyal et al., 2013), a maioria dos estudos foram feitos

com animais já obesos e/ou submetidos a dietas hiperlipídicas ou hiperglicídicas (Kinsell et al., 1958; Mercer e Trayhurn, 1987; Okuno et al., 1997), sem a utilização de um grupo controle saudável com dieta padrão (Buckley e Howe, 2009; Raclot e Oudart, 1999).

1.2. Óleo de arroz.

A utilização do óleo de arroz para o consumo alimentar teve início na Índia na década de 80 (Purushothama et al., 1995). Naquela época o país apresentava dependência de importação e escassez de óleos comestíveis, o que o levou a explorar sementes nativas como o algodão e arroz.

Das 130.000 toneladas de óleo de arroz produzidas da época 85% era utilizado na fabricação de sabão, tintas e lubrificantes, e o restante para o consumo alimentar (Sharma e Rukmini, 1986). O óleo tomou popularidade e o aumento do consumo na dieta levaram os pesquisadores a testar a toxicidade do produto. Foi observado que 10% de óleo de arroz na dieta se apresenta seguro e sem efeitos adversos em ratos Wistar saudáveis durante 3 gerações, quando comparado com o grupo que ingeriu óleo de amendoim (Rukmini, 1988).

Na mesma época, os pesquisadores investigavam o óleo sobre o perfil lipídico de animais hipercolesterolêmicos (Sharma e Rukmini, 1986). Os resultados foram promissores e assim, o óleo também foi testado em humanos hipercolesterolêmicos. Reproduziram o efeito de redução dos níveis de colesterol encontrado nos animais, levando a hipótese que o óleo de arroz poderia ser utilizado na prevenção de doenças cardíacas (Raghuram et al., 1989).

O óleo é extraído do farelo do grão de arroz através de vários processos físico-químicos da moagem do grão para melhorar o sabor, odor, aparência e eliminar impurezas. Há vários processos industriais que extraem o óleo de sua matéria prima, e dependendo dos métodos utilizados o conteúdo dos compostos podem variar (Paucar-Menacho da Silva, 2007).

O farelo compõe cerca de 6-10% do total do grão (Figura 1), e constitui a maior concentração de lipídeos, cerca de 12-18%. Enquanto o grão possui apenas 0,8% (Paucar-Menacho da Silva, 2007), justificando porque o óleo é extraído do farelo.

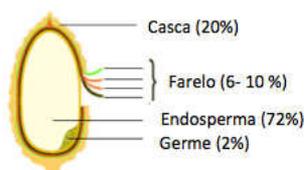


Figura 1: Estrutura do grão de arroz (Adaptado de <http://www.ricebranoil.info>).

Dentre os compostos extraídos do farelo de arroz 90 a 96% são lipídeos saponificáveis, ou seja, ácidos graxos saturados e insaturados, e 3 a 5% são lipídeos insaponificáveis que compreende a família dos antioxidantes e fitoquímicos bioativos descritos na Tabela 1 (Paucar-Menacho e da Silva, 2007).

Os principais lipídeos saponificáveis que constituem o óleo são os ácidos graxos saturados (22,6%), monoinsaturados (41%) e poli-insaturados (36,4%). São chamados saponificáveis pois se submetidos a uma adição de álcalis tornam-se sabões.

Tabela 1: Composição do lipídeos saponificáveis e insaponificáveis do óleo de arroz

<i>Lipídeos saponificáveis</i>		<i>Lipídeos insaponificáveis</i>	
<i>Principais Componentes</i>	<i>g/100g</i>	<i>Principais Componentes</i>	<i>/100g de gordura</i>
<i>Ácido Palmítico (16:0)</i>	21,59	γ -oryzanol (g)	3,21
<i>Ácido Esteárico (18:0)</i>	1,96	α -tocoferol (mg)	15,4
<i>Ácido Oleico (18:1)</i>	40	β -tocoferol (mg)	0,9
<i>Ácido Linoleico (18:2)</i>	34,5	γ -tocoferol (mg)	5,5
<i>Ácido Linolênico (18:3)</i>	1,8	δ -tocoferol(mg)	0,8

Valores fornecidos através método de extração físico patenteada pela empresa HT Nutri.

Estudos, utilizando 10% de óleo de arroz (fonte de ácidos graxos poli-insaturados), diminuíram as concentrações plasmáticas de colesterol total, das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) de animais hipercolesterolêmicos quando comparado com óleo de amendoim (Sharma e Rukmini, 1986; Seetharamaiah e Chandrasekhara, 1989), óleo de coco, ou com de gergelim (Reena e Lokesh, 2007). Esses efeitos foram associados a prevenção de doenças cardíacas. Esses mesmos efeitos foram observados em humanos hipercolesterolêmicos (Berger et al., 2005; Eady et al., 2011) e hiperlipidêmicos (Kuriyan et al., 2005; Kennedy et al., 2010; Zavoshy et al., 2012).

A literatura também apresentou evidências que a ingestão de 5 a 20% de óleo

na dieta de animais sem patologia pode apresentar alteração dos níveis das lipoproteínas de alta densidade (HDL), quando comparado com óleo de amendoim. Contudo, o aumento foi observado apenas na dosagem maior (Purushothama et al., 1995).

A possível explicação para esses resultados foram os componentes tocoferóis e ácidos ferulícos presentes na porção insaponificável do óleo (Tabela 1). Dependendo do método de extração, a porção insaponificável pode variar de 1 até 4% de quantidade de lipídeos insaponificáveis (Sugano e Tsuji, 1997).

A empresa HT Nutri, fornecedora do óleo de arroz analisado nesse estudo utiliza métodos físicos que evitam a eliminação em massa de lipídeos insaponificáveis junto com as impurezas do processo químico geralmente empregado. Essa tecnologia de extração é patenteada pela empresa e mantém altos teores de lipídeos insaponificáveis no óleo produzido. Os valores encontrados estão descritos na Tabela 1.

O principal componente investigado da porção insaponificável tem sido o gama-oryzanol, que foi originalmente caracterizado como um único composto com ésteres de ácido ferúlicos. Porém, atualmente, com a evolução de técnicas laboratoriais já se sabe que o composto faz parte da família de mais de 10 componentes bioativos (Xu e Samuel, 1999).

Os principais componentes da família gama-oryzanol são denominados de β -Sitosteril ferulato(25%), 24-Metileno cicloartenil ferulato (15%) e Campesteril ferulato (9,2%), como apresentados na Figura 2A. Todos os componentes do gama-oryzanol contem uma unidade de ácido ferúlico e uma porção com 28 a 29 carbonos formando quatro anéis aromáticos (anéis tetracíclicos), chamado esterol (Figura 2B) ou álcool triterpeno (Islam et al, 2011). Quando presente em frutas e vegetais o radical esterol é nomeado de fitoesterol (*fito* em latim), ou colesterol, quando presente nos animais.

Os fitoesteróis encontrados no óleo de arroz, assim como os tocotrienóis e tocoferóis apresentam grande contribuição no efeito hipolipidêmico do óleo por inibir a atividade da enzima responsável pela síntese de colesterol, a HMG-CoA redutase (Mäkynen et al., 2012; Minhajuddin et al., 2005). E também diminuem a absorção do colesterol no intestino através da formação e excreção de micelas lipídicas (Rong et al., 1997).

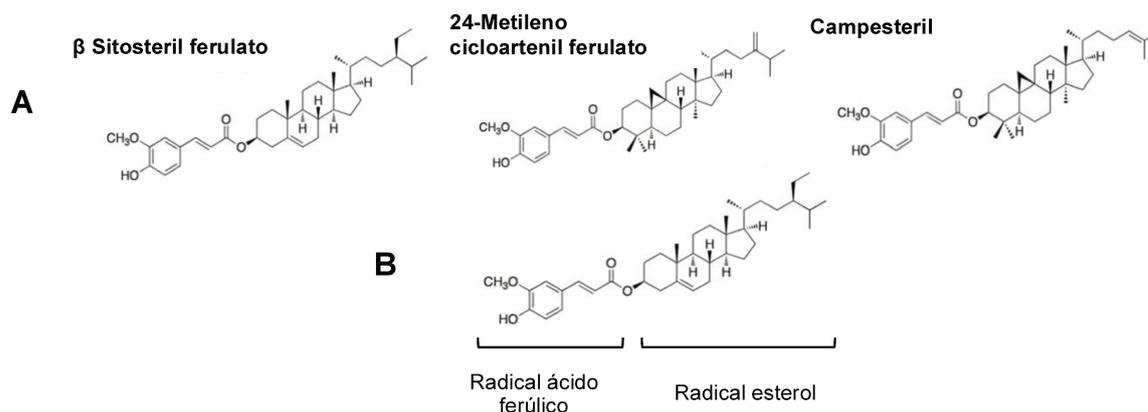


Figura 2: Principais componentes da família gama oryzanol(A). E nomenclatura estrutural dos ésteres de ácidos ferulicos (B). Fonte: Islam et al,2011

Além do efeito hipolipidêmico, os componentes da família gama-oryzanol também apresentam propriedades antioxidantes (Ristow et al., 2009), atribuídas aos grupos hidroxilas e duplas ligações que doam seus elétrons aos radicais livres. Em sua forma isolada, as propriedades antioxidantes do gama-oryzanol apresentam-se 4 vezes maior que a dos tocoferóis (Kim et al., 1995). Contudo, estudos mostraram que a sinergia dos antioxidantes presentes no óleo contribuíram para o aumento da atividade das enzimas antioxidante das células hepáticas e minimizaram o efeito dos radicais livres nas células de animais diabéticos (Posuwan et al., 2013) e ao estresse oxidativo induzido (Rana et al., 2004).

Alguns estudos *in vivo* e *in vivo* demonstraram que os componentes da família gama-oryzanol, na forma isolada, podem estar relacionados com o aumento da expressão de adiponectina no tecido adiposo. Porém, o aumento só é notado quando também há o aumento da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) (Ohara et al., 2009), ou com a ingestão de óleo de milho comparado com sebo bovino (Nagasaka et al., 2011), ou ainda, em uma dieta hipercalórica (Wang et al., 2015).

Outra função fisiológica proposta para o composto em sua forma isolada é o aumento de massa e força muscular devido a sinalização e participação do composto na síntese de testosterona e hormônio do crescimento (Eslami et al., 2014). Com essa descrição o produto é comercializado popularmente em vários países (Fry et al., 1997). Porém, ha poucos estudos científicos e os resultados são controversos.

Nesse contexto, com exceção de um estudo, todos os estudos sobre os efeitos fisiológicos do óleo de arroz na dieta e no perfil lipídico de animais (Reena e

Lokesh, 2007; Sugano e Tsuji, 1997; Wilson et al., 2007) e humanos foram realizados em populações já hiperlipidêmicas ou hipercolesterolêmicas (Berger et al., 2005; Eady et al., 2011). Além do efeito antioxidante em animais diabéticos (Posuwan et al., 2013) e ao estresse oxidativo induzido (Rana et al., 2004). Porém, doses e pesquisas com uma população saudável sedentária ou engajada em um programa de atividade física ainda são escassas.

1.3. Óleos e gorduras.

Óleos e gorduras são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos vivos. Geralmente, em temperatura ambiente os lipídeos de origem vegetal são encontrados na forma líquida e denominados óleos, enquanto os de origem animal encontram-se no estado sólido e são denominadas de gordura.

Os lipídeos são biomoléculas constituídas por ácidos graxos insolúveis em água e que apresentam diversas funções biológicas, tais como elementos estruturais de membranas biológicas, hormônios, mensageiros intracelulares e também podem ser utilizados como fonte de energia (Nelson e Cox, 2014).

1.3.1. Estrutura e função dos ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos ligados a uma cadeia carbônica com um grupo metila no carbono terminal. Podem apresentar cadeias carbônicas curtas (menos que 4 carbonos), médias (6 a 12 carbonos), longas (14 a 20 carbonos) e muito longas (acima de 22 carbonos). As mais comuns são cadeias longas, principalmente o ácido palmítico (16C). Em alguns casos essas cadeias são totalmente saturadas ou podem conter uma ou mais duplas ligações, denominadas de insaturações (Nelson e Cox, 2014).

Na forma saturada os elétrons dos átomos de carbono são compartilhados com os elétrons do carbono seguinte de forma simples (Figura 3A). Essa configuração permite que os átomos de carbono tenham rotação livre em torno da ligação e a cadeia se apresente mais flexível. Ácidos graxos com essa configuração são mais estáveis e podem se agrupar de forma compacta. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica saturada, maior o ponto de fusão da molécula e em temperatura ambiente terão consistência de cera (Nelson e Cox, 2014).

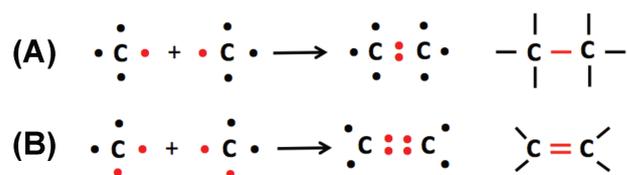


Figure 3: Ligação simples (A) e dupla (B) entre os átomos de carbono. Fonte: Nelson e Cox, 2014

Quando dois átomos de carbono compartilham dois pares de elétrons (Figura 3B) a molécula perde dois átomos de hidrogênio em cada ligação. É descrita como ligação *cis*, pois os átomos de carbonos estão do mesmo lado. Esse tipo de ligação força uma dobra na cadeia carbônica que desordena as interações com outros ácidos graxos. Quanto maior o número de insaturações maior a instabilidade e menor o ponto de fusão das moléculas, o que permite em temperatura ambiente terem consistência líquida (Nelson e Cox, 2014).

Ácidos graxos também podem ser descritos a partir do número de insaturações que a cadeia carbônica apresenta, sendo chamados de ácidos graxos saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados (uma ligação dupla) ou poli-insaturados (mais que uma dupla ligação) (Figura 4).

A nomenclatura comum dos ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados geralmente baseia-se na fonte onde são encontrados em abundância. Assim, o ácido palmítico (16 carbonos) são advindo do latim, *palma*, da planta “palmeira”. Enquanto o ácido oleico (18 carbonos) é derivado do óleo de oliva. Já o ácido linoleico possui origem grega, *linon*, ou linho em português, que é derivado de uma espécie de planta que produz sementes oleaginosas e flores, nomeadas de lináceas.

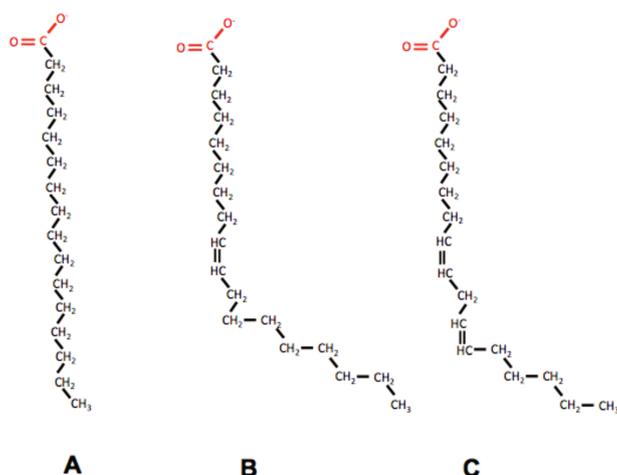


Figura 4. Estrutura dos ácidos graxos saturados com 16 carbonos ácido palmítico (A), mono-insaturado e poli-insaturado com 18 carbonos: ácido oleico (B) e ácido linoleico (C).

Difícilmente ácidos graxos apresentam-se em sua forma livre. Essas moléculas podem estar ligadas a um álcool como o glicerol ou a esfingosina. No primeiro caso os lipídeos formados podem ser armazenados na forma de triacilglicerol (TGA) ou triglicérides nos tecidos. E quando ligados a esfingosina podem apresentar funções estruturais nas membranas biológicas (Marzzoco e Torres, 2007).

As propriedades de fluidez das membranas são determinadas principalmente pela presença de ácidos graxos poli-insaturados nas moléculas de fosfolipídeos (Catalá, 2009). O comprimento e o número de insaturações presentes na cadeia carbônica dos TGA podem determinar a fluidez ou rigidez de uma membrana biológica (Nelson e Cox, 2014). Quanto maior a quantidade de duplas ligações mais fluida será a membrana, devido a instabilidade da insaturação dos ácidos graxos.

No início do século XX acreditava-se que os ácidos graxos em geral eram apenas fonte de calorías armazenada em plantas e animais, ou moléculas veículo para absorção de vitaminas lipossolúveis. Porém, na década de 30 foi demonstrado que os ácidos graxos poli-insaturados poderiam apresentar efeito bioativo e serem essenciais na dieta dos animais.

No estudo de Bur e Bur (1929, 1930) os autores observaram que animais saudáveis com privação de lipídeos desenvolviam doenças com algumas características específicas que levavam a morte. Por esse motivo os autores sugeriram o termo ácido graxo essencial para os ácidos linoleico (18:2) e linolênico (18:3).

1.3.2. Absorção

Após a ingestão de uma refeição gordurosa a absorção dos ácidos graxos pode variar de acordo com o comprimento da cadeia carbônica dos lipídeos ingeridos. Logo no estômago as enzimas gástricas clivam os ácidos graxos de cadeias mais curtas dos TGA em cadeias mais curtas, diacilgliceróis e ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa apresentam-se com maior insolubilidade e o processo de digestão inicia-se na porção proximal do intestino delgado (Figura 5). Nessa porção do intestino a vesícula biliar secreta moléculas anfipáticas chamadas de sais biliares, enquanto o pâncreas secreta a enzima lipase.

A solubilização dos sais biliares com os ácidos graxos e os TGA ingeridos na dieta formam micelas mais acessíveis à ação das lipases pancreáticas (Nelson e Cox, 2014).

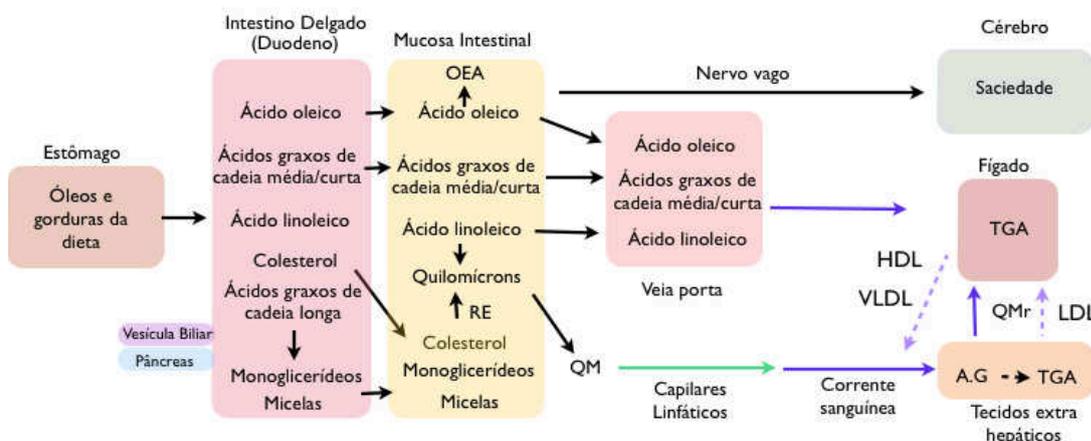


Figura 5: O processo de absorção de óleos e gorduras da dieta. OEA: oleoetanolamina; RE: Reticulo endoplasmático liso; QM: Quilomícrons; A.G: ácidos graxos; HDL: lipoproteína de alta densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

Os ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis clivados pela ação das lipases pancreáticas são difundidos pela mucosa intestinal e nas células epiteliais são convertidos em TGA novamente. Após serem difundidos, o reticulo endoplasmático liso (RE) empacota os TGA e colesterol em proteínas, constituindo uma lipoproteína nomeada de quilomícron (QM).

Ácidos graxos saturados de cadeia curta e média apresentam baixo peso molecular e por esse motivo são relativamente solúveis em água comparado com os ácidos graxos de cadeia longa, o que facilita a ação da enzima lipase pancreática. Conseqüentemente, são rapidamente hidrolisados e ligados a albumina para neutralizar sua insolubilidade. São absorvidos e transportados para o fígado através da veia porta (Bach e Babayan, 1982). Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa não apresentam baixo peso molecular. Porém, as insaturações da molécula permitem maior solubilidade em água e 56% os ácidos linoleico e linolênico também são absorvidos diretamente no fígado via sistema porta (McDonald et al., 1980; McDonald e Weidman, 1987).

Ácidos graxos monoinsaturados como o ácido oleico podem ser absorvidos tanto pelo sistema porta (15%) quanto pelo sistema linfático (85%) (Hyun et al., 1967). Nas células epiteliais podem ser convertidos a oleoetanolamina (OEA) e ativar fibras sensoriais do nervo vago, por mecanismos ainda indefinidos, levando

sinais de saciedade ao hipotálamo, que é o centro regulador do comportamento alimentar (Piomelli, 2013).

Outra sinalização que pode aumentar a saciedade de forma aguda é a dilatação estomacal e secreção de peptídeos como a colecistoquinina (CCK), que também modulam o comportamento alimentar através da sinalização via nervo vago ao hipotálamo (Kenny, 2011).

1.3.3. Transporte dos lipídeos da dieta para os tecidos extra-hepáticos.

Por conta da insolubilidade em água os lipídeos ingeridos e absorvidos via sistema porta ou linfático são transportados para os tecidos extra-hepáticos através da corrente sanguínea como complexos de proteínas carregadoras de triglicérides que apresentam diferentes densidades e conteúdos de TGA, colesterol e proteínas (Tabela 2).

Tabela 2: Conteúdo de TGA, colesterol e proteínas das principais lipoproteínas plasmáticas.

<i>Lipoproteínas</i>	<i>Densidade (g/ml)</i>	<i>Composição (% da massa)</i>		
		<i>TGA</i>	<i>Colesterol livre</i>	<i>Proteínas</i>
<i>Quilomícrons</i>	<1,006	85	1	2
<i>VLDL</i>	0,95-1.006	50	7	10
<i>LDL</i>	1.006-1.063	10	8	23
<i>HDL</i>	1.063-1.210	4	2	55

Fonte: (Nelson e Cox, 2014).

O primeiro passo do transporte é realizado através dos quilomícrons sintetizados no RE liso a partir dos TGA e colesterol absorvidos da dieta. Os QM difundem-se primeiramente pelo sistema linfático e logo depois para a corrente sanguínea através da veia subclávia, onde distribuem TGA para todos os tecidos extra hepáticos que necessitam de energia.

Após a entrega de TGA e ácidos graxos aos tecidos os quilomícrons remanescentes (QMr) retornam ao fígado com a quantidade restante de TGA e colesterol (Nelson e Cox, 2014).

No fígado os TGA absorvidos via veia porta ou transportados pelos quilomícrons remanescentes podem ser utilizados como fonte de energia ou quando a oferta de lipídeos da dieta é maior que a requisitada pelas células, são novamente empacotados como lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e exportados

para a oxidação de ácidos graxos nos miócitos, ou estocagem no tecido adiposo. Essa distribuição de TGA converte as VLDL em VLDL remanescentes (VLDLr). A remoção dos TGA das VLDLr é feita pela LDL que contém muito mais colesterol do que TGA na sua composição (Nelson e Cox, 2014).

Enquanto os QM, VLDL e LDL transportam TGA e colesterol da dieta ou do fígado para os tecidos extra-hepáticos, moléculas de HDL são sintetizadas no intestino delgado e no fígado, e tem como função a coleta de colesterol e TGA dos tecidos extra hepáticos para o fígado (Rader et al., 2003), ou seja, o caminho reverso.

A literatura aponta que o aumento de HDL parece ser benéfico para a saúde e prevenção de doenças coronarianas. Por outro lado, o aumento das concentrações plasmáticas de VLDL e LDL apresentaram correlação positiva com a hipercolesterolemia e risco de doença arterial coronariana, que podem levar a morte (Rader et al., 2003).

1.4. Tecido adiposo

O tecido adiposo é constituído principalmente por células chamadas adipócitos, cuja função mais evidente é o armazenamento dos lipídeos da dieta e manutenção da homeostase energética. O excesso de calorias advindas da dieta na forma de TGA são armazenadas nos adipócitos, sem apresentar lipotoxicidade para a célula, e podem ser liberadas de acordo com a demanda energética requisitada por todos os órgãos e tecidos (Rutkowski et al., 2015).

O tecido adiposo pode ser dividido em três subtipos, segundo sua coloração: branco, marrom e bege. Uma característica dos adipócitos marrons ou bege é a grande quantidade de citocromo oxidase nas mitocôndrias e alta vascularização. Dessa forma, a grande quantidade de Fe⁺ presente no grupo heme dos citocromos em conjunto com o grupamento heme das hemoglobinas nos capilares apresentam a coloração bege e marrom dos tecidos (Nelson e Cox, 2014).

O tecido marrom é encontrado principalmente em bebês e animais hibernantes (Ouchi et al., 2011). Porém, já se sabe que adultos saudáveis também apresentam uma pequena quantidade desse tecido na região subescapular, cervical e perirenal. Ao contrário do tecido branco ambos produzem calor e colaboram para a manutenção da temperatura corporal (Enerbäck, 2013).

Os adipócitos brancos, os quais daremos mais ênfase, é o mais abundante na região subcutânea e visceral. Estão organizados em lóbulos separados por tecido conjuntivo e localizados entre a derme e os músculos, em uma região chamada subcutânea ou hipoderme.

Há também o tecido adiposo visceral, localizado dentro da cavidade abdominal em volta dos órgãos. Esse pode ser classificado em três tipos: gordura periepídimal, retroperitoneal, omental e mesentérica. Ácidos graxos que não são armazenados nos tecidos adiposos são nomeados de gordura ectópica (Ouchi et al., 2011).

Durante muitos anos o tecido adiposo branco foi considerado um órgão cuja única função era a de armazenar energia de longo prazo. Isso continua verdade. Porém, novas evidências têm apontado para o tecido adiposo como um órgão endócrino, com um papel regulador chave de funções metabólicas, devido a secreção de moléculas sinalizadoras chamadas de adipocinas (Hassan et al., 2012).

Uma das primeiras adipocinas descobertas foi leptina (do grego *leptos*, magro), descrita originalmente a partir de camundongos ob/ob. A falta da expressão de nesses animais resultou em hiperfagia, ganho de massa exacerbado e resistência a insulina, sugerindo um papel importante da leptina no controle da ingestão alimentar e regulação da homeostase energética (Zhang et al., 1994; Frederich et al., 1995b).

Atualmente já está bem estabelecido que os receptores de leptina são expressos no hipotálamo e estão localizados em neurônios anorexígenos que regulam o comportamento alimentar (Hommel et al., 2006). Também é consenso na literatura que a leptina é expressa e liberada de forma proporcional aos estoques de tecido adiposo (Lee et al., 2001). Demonstrou-se que o aumento das concentrações plasmáticas pode inibir a fome e aumentar a saciedade alimentar (Schwartz et al., 2000).

Além do papel na saciedade alimentar, o aumento das concentrações plasmáticas de leptina no período pós prandial também pode prevenir o acúmulo de gordura ectópica em órgãos como fígado e pâncreas (Rutkowski et al., 2015). Esse processo é regulado através do aumento de fatores de transcrição que regulam a oxidação e biogênese mitocondrial como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma α (PPAR α) nesses tecidos (Unger, 2003). Assim, dietas hiperlipídicas podem aumentar em até 150 vezes a quantidade de lipídeos no tecido adiposo e

apenas de 5 a 10 vezes em outros tecidos como pâncreas, fígado, coração e musculo esquelético (Lee et al., 2001). Em contraste, a leptina também apresenta um papel pró-inflamatório, com potencial efeito pró fibrogênico e aterogênico e aumento do estresse oxidativo nas células (Hassan et al., 2012).

Outra adipocina expressa pelo tecido adiposo branco é a adiponectina, que apresenta uma correlação inversamente proporcional com a quantidade de tecido adiposo branco e correlação positiva com a sensibilidade a insulina (Nannipieri et al., 2007). Ao contrário da leptina, as concentrações plasmáticas da adiponectina apresentam efeitos anti-inflamatórios, como a inibição de citocinas inflamatórias como o fator necrose tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL-6) e estresse oxidativo (Ouchi et al., 2011).

Além dos adipócitos o tecido adiposo também apresenta outros componentes como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, pré adipócitos, células endoteliais e vasculares. Os macrófagos e linfócitos fornecem o estado imune dos adipócitos enquanto os fibroblastos produzem componentes da matriz extracelular para fornecer suporte mecânico (Ouchi et al., 2011). Qualquer molécula secretada de forma disfuncional por esses componentes, podem desencadear um desequilíbrio e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Parece que a quantidade de tecido adiposo estocado determina a secreção de adipocinas anti ou pró-inflamatórias e a relação com a disfunção do órgão, podendo desencadear doenças como diabetes, esteatose hepática e doenças cardíacas (Ouchi et al., 2011).

1.5. Fígado

O fígado é o maior dos órgãos viscerais internos. Pesa cerca de 1,5 kg em seres humanos adultos e é responsável por múltiplas funções do metabolismo tais como síntese, armazenamento e redistribuição de nutrientes como os carboidratos, aminoácidos e gorduras para todos os outros tecidos (Zhu et al., 2012).

O fígado apresenta diversas células com distintos fenótipos como os hepatócitos, células de Kupffer, células estreladas, células dendríticas e células endoteliais e vasculares. Dentre todas, a principal célula constituinte é a célula hepática, também chamada de hepatócito. Os hepatócitos se agrupam em cordões, de forma análoga a tijolos de um muro (Junqueira e Carneiro, 2008). Recebem cerca

de 75% dos nutrientes absorvidos através de vasos eferentes da veia porta e o restante da artéria hepática.

Os metabolitos produzidos são drenados e transportados através do lúmen dos capilares sinusóides que compõe o sistema de distribuição, e são levados até as veias centrolobulares para a excreção e distribuição para os ramos da veia hepática (Figura 6) (Adams e Eksteen, 2006).

Os capilares sinusóides são constituídos por células endoteliais com inúmeras fenestras dispostas como “peneiras” que ocupam 68% do revestimento. Apresentam papel importante no balanço de lipídeos, colesterol e vitamina A, pois controlam a entrada desses componentes presentes nos QMr. Além disso, o lúmen desses capilares também é composto por células de Kupffer, que regulam as respostas imunes do tecido (Wisse et al., 1996).

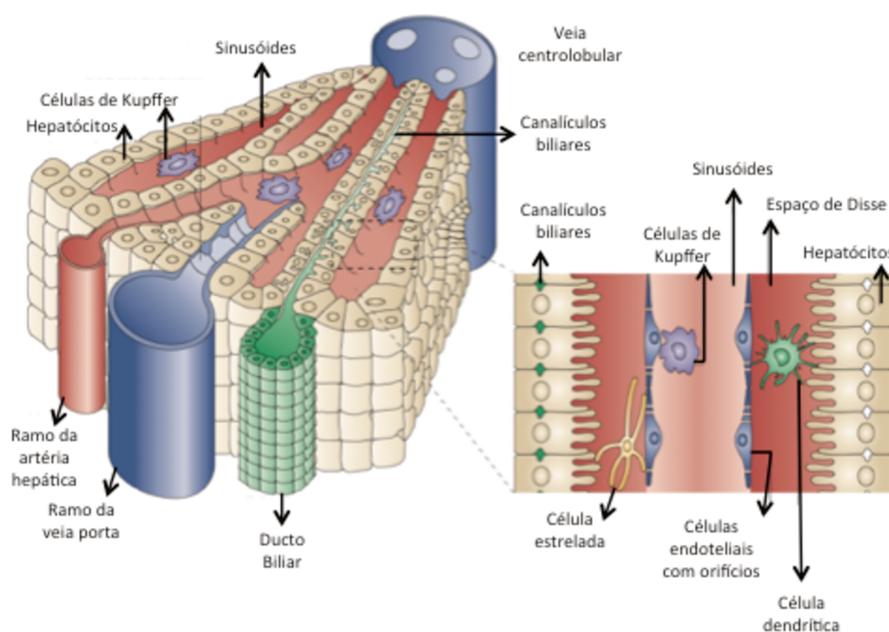


Figura 6: Esquema tridimensional dos componentes estruturais do fígado. Fonte: Adams e Eksteen, 2006

Entre as células endoteliais e os hepatócitos há um estreito espaço chamado de espaço de disse (Figura 6), revestido por fibras de colágeno, células dendríticas e células estreladas, ou também chamadas de células de Ito (Junqueira e Carneiro, 2008).

As células estrelas estão presentes em maior parte nas regiões proximais das veias centrolobulares. Quando quiescentes são responsáveis pelo armazenamento de vitamina A, produção de colágeno, fibronectina e outros componentes da matriz extracelular para a sustentação do tecido (Wisse et al., 1996). As células endoteliais

regulam a porosidade, número e tamanho das janelas através dos componentes do citoesqueleto.

Em casos de doenças como a esteatose hepática as células estreladas são ativadas, se diferenciam, aumentam a produção de colágeno do tipo I e IV, formando uma densa camada no espaço de Disse. Essa mudança de fenótipo da matriz extracelular bloqueia as janelas endoteliais e impede a troca de substâncias do sangue (Wisse et al., 1996).

1.5.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e células do fígado.

As estruturas de átomos e moléculas geralmente apresentam pares de elétrons se movendo dentro de uma região definida como espaço ou orbital. Radical livre é qualquer espécie capaz de existir de forma independente (livre), e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (radical), como representado na Figura 7 (Halliwell, 2001; Gandra et al., 2006). Essa configuração no orbital do átomo ou molécula a torna altamente reativa e instável. Assim, para se tornar estável irá oxidar (roubar) elétrons de outras moléculas.

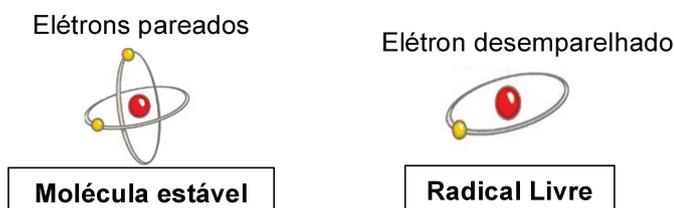


Figura 7: Distribuição eletrônica simplificada das moléculas estáveis e dos radicais livres

A principal fonte de energia utilizada pelos hepatócitos é advinda da oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias. Para a produção de ATP e oxidação completa dos ácidos graxos é necessário que a molécula de oxigênio (O_2) seja reduzida a água (H_2O) de forma monoeletrônica no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (Figura 8). As espécies intermediárias formadas dessa redução são chamadas de Espécies Reativas de oxigênio (EROs).

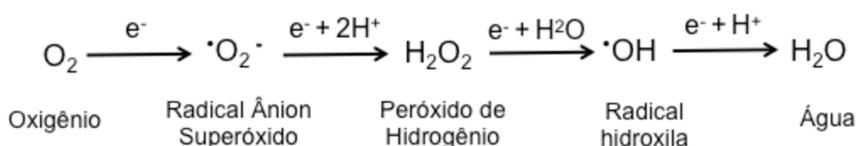


Figura 8: Redução monoeletrônica da molécula de oxigênio no complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e seus intermediários

A molécula de H₂O é o único produto da reação catalisada no complexo IV (Gandra et al., 2006). No entanto, o escape de elétrons pelos complexos I e III mitocondrial podem reduzir a molécula de oxigênio monoelêtronicamente e produzir o radical ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).

Uma vez produzido o $\cdot\text{O}_2^-$ inicia-se o processo de produção das outras EROs. Isso porque o $\cdot\text{O}_2^-$ pode ser rapidamente dismutado à peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). O H₂O₂ não apresenta elétrons desemparelhados em sua estrutura, e assim não pode ser classificado como um radical livre. Porém, na presença de íons de metais de transição como o Fe²⁺ ou Cu⁺ podem reagir com essas moléculas e originar o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que é altamente reativo e oxidante, por conta de sua meia vida muito curta (Gandra et al., 2006).

Embora em muitos tecidos as mitocôndrias tenham se mostrado a organela responsável pela maior produção de EROs, no fígado essa conclusão apresenta algumas controvérsias (Brown e Borutaite, 2012). Os hepatócitos apresentam enzimas ativas no sistema redox como a enzima xantina oxidase, citocromo p450, cicloxigenases, lipoxigenases e óxido nítrico sintase (NOS) que também produzem $\cdot\text{O}_2^-$ (Crosas-Molist e Fabregat, 2015).

Além disso, outra via que também pode contribuir para a formação de EROs no fígado é o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. A NADPH oxidase é encontrada tanto nas membranas das células fagocitárias quanto nas células não fagocitárias como as células endoteliais, hepatócitos e células estreladas (Paik et al., 2014). Quando ativado o complexo enzimático NADPH oxidase reduz o O₂ à custa de NADPH ou NADH, produzindo $\cdot\text{O}_2^-$. Nas células de Kupffer a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ é extracelular, e desenvolve um papel chave na defesa contra parasitas e infecções.

Radicais livres e EROs são constantemente geradas em nosso organismo em pequenas concentrações, sendo considerados sinalizadores de várias funções importantes nas células como síntese de hormônios, regulação de fosforilação de proteínas e ativação de fatores nucleares (Halliwell, 2001). Porém, o aumento exacerbado da produção de EROs pode inibir a função da bomba sódio potássio (Zhu et al., 2012), causar danos as membranas plasmáticas dos componentes

celulares e aumentar as concentrações plasmáticas de LDL oxidada (Zambó et al, 2013).

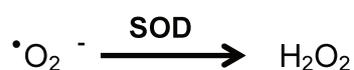
Para impedir os danos oxidativo ocasionado pelo aumento da produção de EROs e conseqüentemente do potencial oxidante as células apresentam um sistema de defesa denominado de antioxidante.

1.5.2.Sistema de defesa antioxidante.

Segundo Halliwell (2001) antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixa concentração quando comparada com um substrato reduzido é capaz de retardar ou prevenir de forma significativa a oxidação do substrato (Halliwell, 2001).

O sistema de defesa é constituído pelos antioxidantes de baixo peso molecular e principalmente pelo sistema enzimático. Os antioxidantes de baixo peso molecular tais como vitamina C, tocoferóis, flavonoides e fitoesteróis entre outros podem ser ofertados pela dieta. Os α -tocoferóis podem inibir a cascata de reações da peroxidação lipídica, sendo considerados um dos principais antioxidantes das membranas biológicas (Halliwell, 2001)

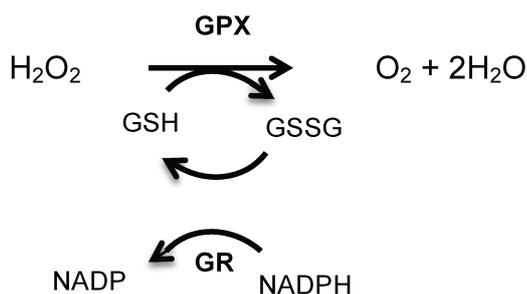
O primeiro passo da defesa antioxidante enzimática é caracterizado pela dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 pela ação da enzima SOD, como demonstrado abaixo. Esta enzima esta presente no citosol na forma dependente de Cu^{2+} e Zn^{2+} e na matriz mitocondrial na forma dependente de Mn^{2+} (Anderson, 1996).



A neutralização do H_2O_2 pode ser catalisada por duas enzimas com atividade peroxidase, a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPX). A enzima CAT esta presente em alta concentração nos peroxissomos dos hepatócitos e decompõe o H_2O_2 a $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (Chance et al., 1979).



O sistema enzimático GPx/ Glutaciona Redutase (GR), pode ser encontrado no citosol e na matriz mitocondrial. A ação em conjunto destas duas enzimas é dependente da quantidade de glutaciona reduzida (GSH) e do selênio como cofator das enzimas.



O primeiro passo é a dismutação do H_2O_2 pela ação da GPX, a partir de GSH. A glutathiona oxidada (GSSG) é regenerada às custas dos elétrons do NADPH transferidos pela enzima GR.

Já o $\cdot\text{OH}$ é altamente reativo e uma vez produzido não possui enzimas contra sua ação nas células.

1.5.3. Estresse oxidativo

O fígado apresenta uma capacidade antioxidante relativamente mais alta quanto comparada com outros órgãos (Tian et al., 1998). Contudo, quando há maior produção de EROs frente a capacidade antioxidante do tecido instala-se um quadro de estresse oxidativo que pode desencadear perda de função do tecido, danos celulares e doenças crônicas (Halliwell, 2001).

Um dos danos teciduais mais comuns que o aumento de EROs pode acarretar é a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular. Esse processo é chamado de peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica inicia-se com remoção de um átomo de hidrogênio da cadeia carbônica dos ácidos graxos. Essa oxidação do átomo de carbono desencadeia uma cascata de reações químicas que tem como produto final aldeídos reativos que podem reagir com proteínas estruturais, DNA e causar dano tecidual (Catalá, 2009).

Quando em homeostasia as células estreladas apresentam-se em seu estado quiescente. Porém, quando ativadas em consequência do aumento da produção de EROs, de dano tecidual ou das concentrações plasmáticas de leptina (Schroyen et al., 2012) essas células se proliferam, diferenciam-se e geram uma resposta fibrogênica, depositando grande quantidade de colágeno na matriz extracelular dos

hepatócitos danificados, e produz também grande quantidade de $\cdot\text{O}_2^-$ para remover proteínas danificadas e reparar o dano tecidual (Odena e Bataller, 2012).

No fígado o quadro de estresse oxidativo e ativação de células estreladas pode ser um dos principais fatores para o desenvolvimento de fibrose, inflamação crônica e morte celular, que estão associadas a doenças hepáticas não alcoólicas (Cichoż-Lach e Michalak, 2014; Day, 2002).

2. OBJETIVOS.

A literatura relacionada aos efeitos de suplementações com óleos vegetais ainda é incipiente, principalmente o óleo de arroz, e seus efeitos no fígado, marcadores de saciedade, de perfil lipídico e ganho de massa em animais e humanos saudáveis. Essa dissertação de mestrado é resultado da parceria entre o Laboratório de Bioquímica do exercício (Labex) e a empresa HT Nutri, produtora do óleo de arroz. O objetivo comum foi verificar a segurança para a comercialização do óleo de arroz como suplemento alimentar para pessoas saudáveis. Para isso, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da suplementação com óleo de arroz durante 8 semanas com diferentes dosagens, no comportamento alimentar e no fígado de animais jovens saudáveis.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comportamento Alimentar

O comportamento alimentar foi avaliado após a primeira, quarta e oitava semana de suplementação através do consumo de ração e ganho de massa (total e adiposa do epidídimo) após 8 semanas do protocolo de suplementação através das variáveis: percentual de macronutrientes ingeridos da dieta padrão, parâmetros hormonais (concentrações séricas de leptina, adiponectina e testosterona) e bioquímicos (glicemia, uremia e perfil lipídico).

Fígado

O efeito do consumo crônico de quantidades crescentes de lipídeos provenientes da suplementação com óleo de arroz no fígado dos animais foi

avaliado através de análise morfológica, de marcadores de estresse oxidativo e marcadores de função hepática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais.

Foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Unicamp 40 ratos albinos machos da linhagem *Wistar*, com 21 dias de idade. Para a adaptação ao novo ambiente os animais foram acomodados em grupos de 4 animais por gaiola (46X24X20 cm³), e alojados em biotério climatizado a 25±1°C, com controle invertido de luz claro:escuro de 12 h. Os animais receberam água e dieta padrão (Nuvital - Nuvilab CR-1 autoclavável) *ad libitum* durante todo o experimento.

Após o período de adaptação ao biotério (4 semanas) os animais com massa média de 330,2 ± 20,4 g foram separados em 4 grupos experimentais (n=10 cada). O grupo controle (GCon) recebeu um volume fixo de água e os outros três grupos foram suplementados com volumes fixos e crescentes de óleo de arroz (1 mL, 2 mL e 6 mL) durante 8 semanas. O grupo suplementado com 1mL de óleo de arroz representa o grupo suplementado com a dosagem mínima, sendo denominado de GMin. O grupo suplementado com 2mL representa o grupo suplementado com a dosagem mediana (GMed) e o grupo suplementado com 6mL representa a dosagem máxima (GMax) de óleo de arroz.

As dosagens utilizadas para os grupo GMin, GMed e GMax foram selecionadas a partir de experimento piloto onde avaliamos a capacidade estomacal dos animais, baseando-se em estudos que utilizaram gavagem estomacal com outros óleos vegetais (Rusyn et al., 1999). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEUA) do IB-UNICAMP (Protocolo 2626-1- Anexo III).

Durante as 8 semanas do protocolo os animais foram mantidos em gaiolas individuais (46X24X20 cm³), e mantidos com uma dieta com ração padrão (Tabela 3) e água *ad libitum*. A suplementação com óleo de arroz foi feita durante 5 dias (terça a sábado), com dois dias de descanso (domingo e segunda).

Tabela 3: Composição da ração Nuvilab CR-1 Autoclavável

<i>Carboidratos</i>	55%
<i>Proteínas</i>	22%
<i>Lipídeos</i>	4,5%
<i>Fibras e Minerais</i>	18%

3.1.1. Cálculo do consumo de ração e ganho de massa Corporal.

Semanalmente, no primeiro dia de suplementação (T0) adicionou-se 260 g de ração nas gaiolas, e no quinto (T1) mensurou-se o conteúdo restante para calcular o consumo de ração durante o período de suplementação correspondente a cada semana. Os animais também foram pesados nos mesmos momentos, para o cálculo do ganho de massa corporal, através da equação abaixo:

$$[(T0 - T1) / T0] \times 100.$$

onde: T0 foi a massa inicial mensurada no 1º dia de suplementação do protocolo e T1 a massa final da semana.

3.2. Protocolo de suplementação com Óleo de Arroz.

O óleo de arroz foi fornecido pela empresa HT Nutri (Helmut Tessmann Industria e Comercio de óleos Vegetais). O óleo foi recebido semanalmente e separado em alíquotas menores com a quantidade de óleo necessária para a suplementação diária de todos os animais ao longo da semana. As alíquotas foram armazenadas em frascos âmbar e estocadas em temperatura ambiente $28 \pm 2^\circ\text{C}$. A suplementação de óleo de arroz foi realizada por meio de gavagem estomacal (Figura 9).



Figura 9: Procedimento de gavagem estomacal.

Todos os grupos suplementados, com exceção do GMax (6 mL) receberam uma dose única de óleo de arroz no período da manhã. A suplementação do GMax

foi fracionada em 3 doses de 2 mL, com um intervalo de 3 horas entre cada gavagem (7h, 10h e 13h). Para garantir que todos os animais foram submetidos ao mesmo estresse gerado pela cânula inserida no estomago, o grupo controle (GCon) recebeu, 2 mL de água fixos, 5 vezes na semana.

É importante ressaltar que ao longo do protocolo mantivemos os volumes de óleo fixos em cada grupo. Ou seja, ao longo das 8 semanas os animais foram submetidos a dosagens de óleo de arroz em relação à massa corporal progressivamente decrescentes.

A Tabela 4 apresenta a dose ingerida de óleo dos animais em g/kg, relativizada pela massa corporal dos animais no início e após 4 e após 8 semanas de suplementação.

Tabela 4: Dosagem do óleo relativizada pela massa dos animais ao longo das 8 semanas de protocolo. Densidade do óleo: 0,92g/ml

Grupos	Suplementação de Óleo de Arroz		
	Inicial	Após 4 semanas	Após 8 semanas
<i>GMin (g/kg)</i>	2,65 ± 0,18	2,26 ± 0,18	1,98 ± 0,17
<i>GMed (g/kg)</i>	5,40 ± 0,28	4,50 ± 0,24	3,89 ± 0,18
<i>GMax (g/kg)</i>	16,15 ± 0,84	13,95 ± 0,97	12,68 ± 1,09

Observa-se uma redução média de 24% da dose de óleo relativo a massa corporal da primeira para a ultima semana do protocolo.

3.2.1. Dosagem Equivalente para Humanos.

Considerando que os diversos óleos vegetais disponíveis no mercado para uso em seres humanos apresentam recomendações que variam de 1 a 4 colheres de sopa de óleo ao dia calculamos qual seria o equivalente em colheres de sopa para os seres humanos, dos volumes de óleo de arroz suplementados nos animais neste protocolo.

A dose equivalente para humanos (*Human Equivalent Dosage* - HED) foi calculada segundo a equação proposta pelo Guia da *Food and Drug Administration* (2005), que introduz fatores que levam em consideração a área de superfície corporal (K_m) de animais com 150 g ($K_{ma} = 6$) e de um ser humano com 60 kg ($K_{mh} = 37$). Verificamos a adaptação necessária na fórmula para utilizar a massa média de

todos animais (330 g) e recalculamos um novo valor de K_m para a nova massa proposta dos animais e de humanos com 70 kg. Como não observamos diferenças nos valores finais de K_m , decidimos adotar o valor proposto inicialmente. A equação é:

$$HED (mg/kg) = Dose\ administrada\ para\ o\ animal\ (mg/kg) \times \frac{Fator\ Km\ do\ animal}{Fator\ Km\ de\ Humano}$$

Por exemplo, sabendo-se que a densidade (massa/volume) do óleo de arroz administrada em 1mL é de 920 mg, e a massa total média de todos os animais era 0,330 kg dividimos esses valores para obter a dose de óleo administrada para o animal (mg/kg), que foi correspondente a 2.787,87 mg/kg. O próximo passo foi a multiplicação desse valor pelo fator de área de superfície do animal ($K_{ma} = 6$), resultando no valor de 16.727,27, que foi dividido pelo fator de área de superfície do humano ($K_{mh} = 37$). O valor obtido (452,08 mg/kg), corresponde a dosagem de óleo (mg) por massa humana (kg).

Assim, para um adulto de 70 kg, a quantidade de óleo a ser ingerida (452,08 mg/kg x 70 kg), seria de 31.646,19 mg, aproximado 32 g de óleo. Assumindo que em uma colher de sopa rasa cabem 13 mL de óleo de arroz dividimos essa dosagem pelo volume de óleo correspondente a uma colher. Ou seja 32/13, obtendo o valor de 2,46 colheres de óleo de arroz.

Portanto, para um ser humano de 70 kg a suplementação com 1 mL de óleo nos animais equivale a 2,5 colheres de óleo de arroz, enquanto as dosagens de 2 e 6 mL corresponderam a 5 e 14 colheres na primeira semana. Essas dosagens na 8ª semana corresponderam, respectivamente, a 2, 4 e 10 colheres de óleo para um adulto de 70 kg.

3.3. Avaliação “*in vitro*” da presença de antioxidantes no óleo de arroz.

Como uma forma de controle da qualidade do óleo recebido semanalmente avaliamos a capacidade antioxidante total dos compostos presentes no óleo de arroz através de uma adaptação do método descrito por Melo e colaboradores (2005). Essa metodologia foi utilizada para ver se as frações de óleo recebidas continham as mesmas características em relação aos antioxidantes presentes no óleo. A

metodologia propõe o acompanhamento do radical livre estável, não natural 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) no comprimento de onda de 517 nm. No estado oxidado o DPPH apresenta uma coloração violeta intensa, devido à presença de elétrons desemparelhados. Os antioxidantes presentes no óleo de arroz sequestram esses elétrons desemparelhados e a solução passa a apresentar uma coloração amarelo palha, e a absorvância diminui.

Alíquotas de 5 µL de óleo de arroz foram adicionadas a 500 µL de tampão acetato 0.1 M (pH= 5,5) contendo 500 µL etanol e 250 µL de solução etanólica de DPPH 0.5 mM, e as medidas foram realizadas após 30 min de incubação. A redução da absorvância a 517 nm foi expressa em % de atividade sequestradora (AS%), através equação descrita abaixo(Miranda et al., 2006).

$$AS\% = 100 \times \Delta hx$$

$$\Delta hx = hc - hx$$

onde: hc é a absorvância controle (DPPH + solução etílica) e hx é a absorvância teste (DPPH + solução etílica + óleo de arroz). Os resultados obtidos estão apresentados no Anexo I. Não houve alteração significativa da AS% ao longo das 8 semanas de suplementação.

3.4. Eutanásia, coleta de sangue e de tecidos.

A eutanásia foi realizada após 24 h a última suplementação e jejum de 12 h. Os animais foram anestesiados na pata dianteira via intramuscular com 11 mg/kg de Zoletil e 50 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Machado et al., 2009).

Após a anestesia total, verificada através dos reflexos corneais, auriculares e caudal, foi realizada a laparotomia medial e a coleta de sangue através de punção cardíaca no ventrículo esquerdo. O sangue coletado foi rapidamente transferido para tubos à vácuo de sorologia (Vaccuette com Gel separador) e centrifugado a 1700g por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquotado em microtubos, inseridos no nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C no *biofreezer* para posterior análises.

O fígado foi dissecado completamente, pesado e seccionado em 3 fragmentos de 0,5 cm. A primeira secção foi descartada, o segundo fragmento foi imerso em solução de formalina tamponada (10%), e o terceiro armazenado em

nitrogênio líquido e posteriormente em *biofreezer* para futuros ensaios espectrofotométricos. Foi também dissecada e pesada a gordura periepididimal.

3.5. Parâmetros bioquímicos

Na mesma semana do sacrifício as amostras de soro foram descongeladas em temperatura ambiente, sendo utilizadas na determinação da atividade das enzimas Aspartato Transaminase (AST), Alanina Transaminase (ALT), Amilase Pancreática e Fosfatase Alcalina, e das concentrações de Ureia e HDL. Esses analitos foram quantificados utilizando o equipamento Reflotron Plus (Roche), com operações de limpeza do sistema óptico do Reflotron[®], a cada 100 análises, e verificação do sistema com as tiras controle Reflotron[®] Clean + Check.

As análises de Triglicérides e Colesterol Total foram quantificadas através dos kits específicos da marca Laborlab, através do método colorimétrico enzimático no analisador clínico automatizado AUTOLAB18 (*Boehringer Mannheim, Germany*).

3.6. Parâmetros hepáticos

3.6.1. Análises histológicas

Após o período de fixação de 24 h imerso em solução de formalina tamponada os tecidos foram desidratados em soluções crescentes de álcool etílico (80, 95 e 100%), clareadas em xilol (50 e 100%), incluídas em parafina e cortadas com espessura de 6 µm no micrótomo Leica RM 2125 RT. Em seguida foi feita a coloração Hematoxilina e Eosina (H.E) em 9 secções hepáticas. A fotodocumentação foi feita em microscópio Leica DM2000. Para as análises de imagens utilizamos o software *Image Manager* (IM 50). Para as análises morfométricas utilizou-se 30 imagens digitalizadas de hepatócitos de cada animal na objetiva com aumento de 100X. Já para as análises estereológicas foram utilizadas 5 imagens digitalizadas de cada animal na objetiva de 20X. Todas as imagens foram escolhidas aleatoriamente. Utilizou-se o programa ImageProPlus 6.0 para realizar as medidas. Foram medidos os diâmetros maior e menor de cada núcleo do hepatócito. Com uma grade de 494 pontos foram contabilizados os que incidiam sobre o núcleo e

citoplasma dos hepatócitos, lúmen dos capilares sinusóides e veias centrolobulares no GCon (n=6), GMin(n=9), GMed(n=10) e GMax (n=8).

O volume do núcleo (1) e do hepatócito (2) foram calculados a partir das seguintes equações (Weibel, 1981).

$$(1) \text{ Volume nuclear: } \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3$$

$$(2) \text{ Volume do hepatócito: Volume núcleo } \cdot (\% \text{ citosol} / \% \text{ núcleo})$$

Onde: r é a média do raio do núcleo obtido de cada animal.

3.6.2. Preparação das amostras de fígado para as análises da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, GR, SOD) e produtos de peroxidação lipídica (TBARs).

Para a preparação dos ensaios das enzimas antioxidantes utilizamos 60 mg de tecido hepático. O tecido foi homogeneizado durante 30s no Politron (Politron PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) e imerso em 3 mL de Tampão contendo sacarose (40mM), EDTA (1 mM), K₂HPO₄ (39 mM), PMSF (Fluoreto de FenilMetilsulfonila) [200mM], etanol (1%) e Triton (1%). Em seguida foi centrifugado a 790g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aliqotado em microtubos e armazenados em nitrogênio líquido. Ao término da preparação os microtubos foram armazenados a -80°C no *biofreezer* até o processamento das amostras.

Já para as análises de quantificação de TBARs utilizamos 200 mg de tecido. Homogeneizamos sobre banho de gelo com homogeneizador Politron durante 30s na razão 1:10 (tecido/vol) em solução KCl (1,15%) e 1 µL PMSF [200 mM]. O sobrenadante foi aliqotado em microtubos e armazenado no nitrogênio líquido e em seguida armazenadas em *biofreezer* até o processamento das amostras.

3.6.3. Análise da Peroxidação Lipídica através da análise de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):

O nível de peroxidação lipídica foi inferido através dos produtos aldeídos resultantes do ataque de EROs a membranas celulares, como por exemplo o malondialdeído (MDA), e outras substâncias que reagem com o ácido 1-tiobarbitúrico (TBARs), produzindo um complexo colorido que absorve luz no comprimento de onda de 532 nm. O ensaio foi adaptado e conduzido conforme os

métodos descritos por Uchiyama (1978) e Ohkawa (1979). A concentração de TBARs foi calculada através da equação da reta ($y = ax+b$) de uma curva padrão de tetraetoxipropano (TEP), relativizado pela quantidade de tecido úmido (ANEXO II).

3.6.4. Análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD):

O ensaio da atividade da enzima SOD foi conduzido segundo as instruções do kit de análises da *Trevigen*®. O princípio do método tem como base a formação de NBT-diformazan, através da conversão de H_2O_2 a $\cdot O_2^-$ pela xantina oxidase (XOD). A enzima SOD catalisa a dismutação do $\cdot O_2^-$ à O_2 e H_2O_2 . A concentração de $\cdot O_2^-$ é determinada pela atividade e concentração de SOD da amostra e inibição na formação de NBT-diformazan adicionado no ensaio (Figura 10). Assim, quanto maior a concentração de SOD no tecido maior será a inibição da formação de NBT-diformazan e menor a absorbância no comprimento de onda de 550 nm.

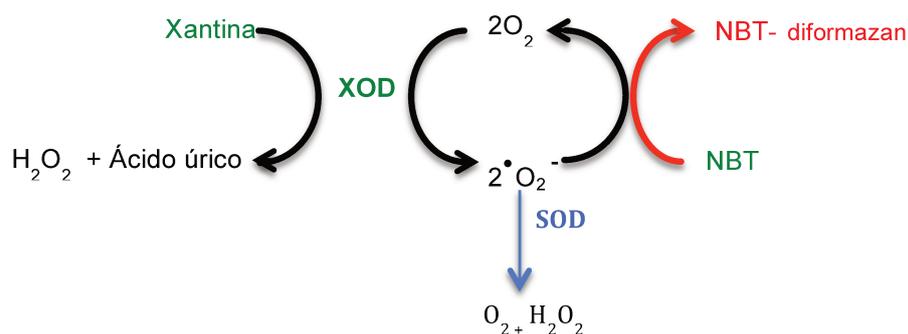


Figura 10: Esquema do ensaio da enzima SOD e formação de NBT-diformazan. Em azul, enzimas da amostra. Em verde, reagentes do ensaio. Em preto, produtos não quantificados. Em vermelho, produto quantificado.

O cálculo da atividade da SOD foi realizado através de uma quantidade conhecida de SOD isolada, fornecida pela *Trevigen* e do percentual de inibição da formação de NBT-diformazan calculado por uma curva padrão (ANEXO II).

3.6.5. Análise da atividade da enzima Catalase (CAT):

A enzima CAT foi quantificada através de uma adaptação do método proposto por Aebi (1984). As amostras foram descongeladas 30 minutos antes do experimento, sendo adicionados ao ensaio etanol a 10% e Triton 1%. A atividade da enzima foi acompanhada em um espectrofotômetro através da decomposição do

H_2O_2 , que reflete diretamente na redução de absorção de luz no comprimento de onda de 240 nm, como demonstrado esquema abaixo.



3.6.6. Análise da atividade da enzima Glutathione Redutase (GR):

A enzima GR foi quantificada por meio da formação de 5,5'-Tiobis ácido 2-nitrobenzóico (TNB) conforme proposto por Smith e colaboradores (1988). O princípio do método baseia-se no aumento da absorbância em um comprimento de onda de 412 nm em consequência da formação de TNB. A enzima GR é dependente de NADP(H), sendo adicionado ao ensaio NADP(H), glutathione oxidada (GSSG) e 5,5'-ditiobinitrobenzóico (DTNB). O DTNB é reduzido por GSH, tendo como produtos da reação GSTNB + TNB, segundo o esquema abaixo (Figura 11).

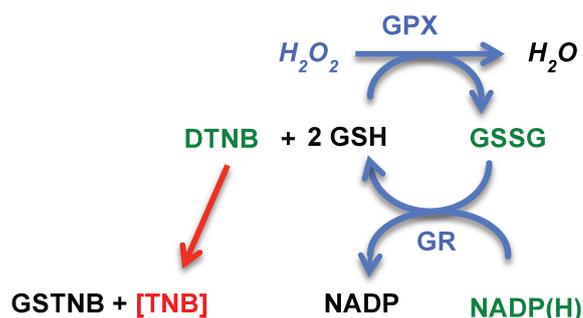


Figura 11: Esquema didático da reação catalisada pela enzima GR e formação de TNB. Em azul, enzimas e substratos da amostra. Em verde, reagentes do ensaio. Em preto, produtos não quantificados. Em vermelho produto quantificado.

3.7. Análise estatística e apresentação dos resultados.

A apresentação dos dados foi descritiva e realizada em gráficos do tipo boxplot, utilizando-se o programa MATLAB 7.0. Este tipo de apresentação possibilita uma melhor visualização da dispersão dos valores obtidos. O gráfico se apresenta como uma caixa (box) com todos os dados distribuídos em quartis, como demonstrado pelas setas em azul na Figura 12.

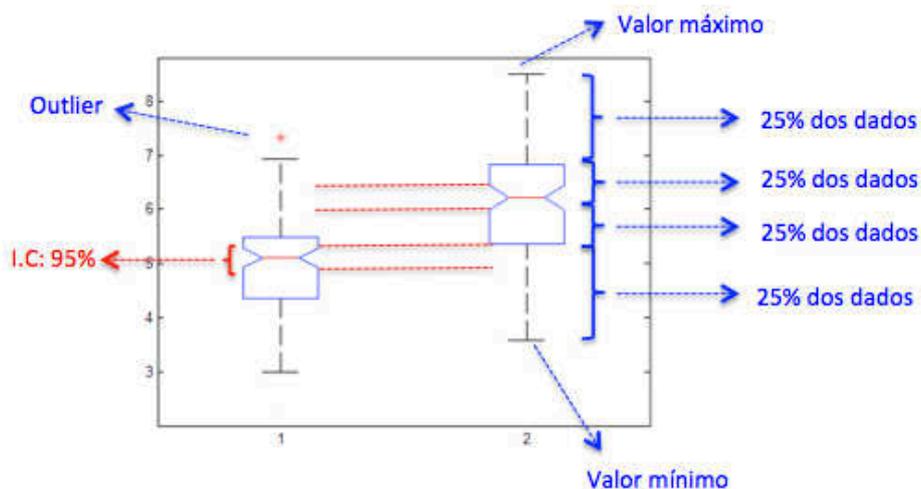


Figura 12: Representação dos dados apresentados na forma de boxplot. Em azul, as informações dos dados fornecidos no boxplot hipotético. E em vermelho, o Intervalo de Confiança de 95% dos dados obtidos sobrepondo o I.C do outro boxplot (linhas vermelhas tracejadas), demonstrando a sobreposição dos dados e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No centro da caixa, em vermelho, o gráfico apresenta a linha mediana dos dados. A caixa corresponde a 50% dos dados e os outros 25% superiores e inferiores estão localizados nas linhas tracejadas. Ao redor da mediana estão localizados os intervalos de confiança (I.C), na forma de abas, que podem apoiar a avaliação visual da significância estatística (McGill et al, 1978). Caso os intervalos de confiança das medianas não estejam sobrepostos podemos inferir que a diferença entre as amostras é significativa.

As análises estatísticas também foram realizadas utilizando-se o programa MATLAB 7.0, com a aplicação do teste *Lilliefor* para a classificação dos dados em paramétricos ou não paramétricos. Para os dados paramétricos a comparação entre os grupos foi realizada através do teste ANOVA one-way com pós teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskalwallis com pós teste de Dunn's. Apenas os dados com valores de $p < 0,05$ foram considerados como diferença estatisticamente significativa.

Para efeito didático, em todos os gráficos o grupo controle (GCon) está representado com um boxplot na cor azul, os suplementados com 1 mL (GMin) em rosa, 2 mL (GMed) em vermelho e 6mL (GMax) em preto.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar.

4.1.1. Consumo de ração.

A Figura 13 apresenta o consumo de ração (g) após as semanas 1, 4 e 8 de suplementação com óleo de arroz nas diferentes dosagens. Como as doses de óleo suplementadas ao longo das 8 semanas foram mantidas fixas, o eixo superior do gráfico apresenta a dosagem de óleo relativizada pela massa dos animais correspondente aos grupos GMin, GMed e GMax nos mesmos momentos.

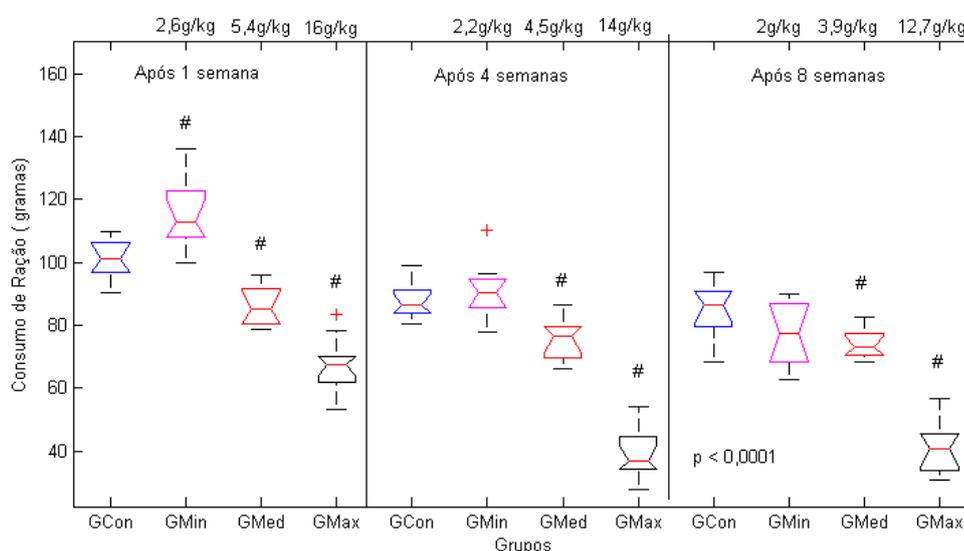


Figura 13: Consumo de ração (em gramas) após a primeira, quarta e 8ª semana de suplementação. Grupo controle GCon (azul); Grupos suplementados com diferentes quantidades de óleo de arroz: GMin (rosa), GMed (vermelho) e GMax (preto). O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo suplementado em relação ao grupo controle.

Observa-se que o GCon apresentou uma diminuição significativa no consumo de ração semanal após a 4ª semana, sem alterações significativas após a 8ª semana do protocolo. Os grupos GMed e GMax apresentaram uma diminuição no consumo de ração ($p < 0,05$) quando comparados com o GCon desde a primeira semana de suplementação.

Chama atenção o comportamento do grupo GMax, com uma queda média de 40g no consumo de ração após 4 e 8 semanas de suplementação, representando uma redução de 47% na ingestão de ração comparado com o GCon. Esse resultado foi observado mesmo com a diminuição na quantidade de óleo relativizada pela

massa (g/kg) dos animais na 8ª semana, quando comparada com o início do protocolo.

Já o GMin passou de um aumento significativo no consumo de ração quando comparado ao GCon após a primeira semana para uma tendência de diminuição após 8 semanas de suplementação.

4.1.2. Ganho de massa

A Figura 14 apresenta o ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos após a primeira, quarta e oitava semanas de suplementação.

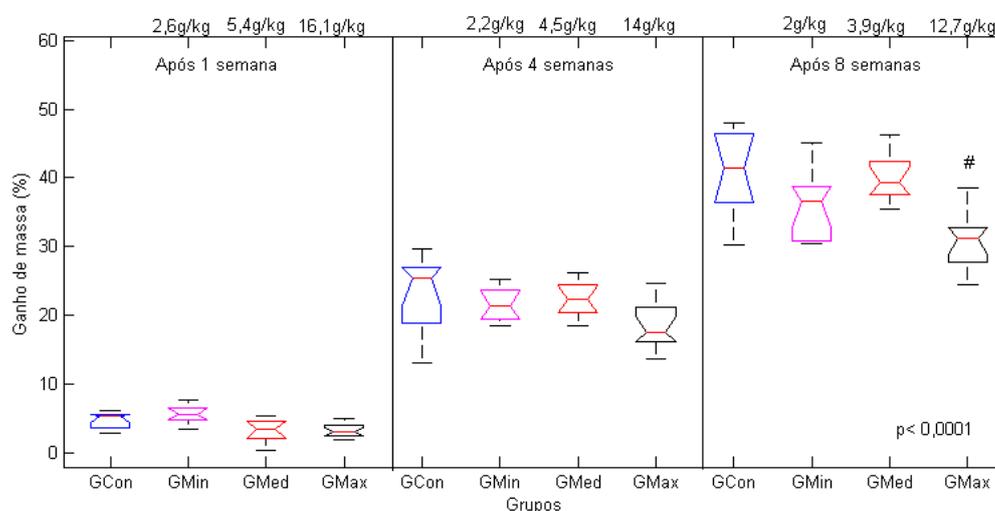


Figura 14: Percentual de ganho de massa relativo a primeira semana: após 1,4 e 8 semanas no grupo controle GCon (azul) ou suplementado com óleo de arroz : GMin (rosa), GMed (vermelho) e GMax (preto). O símbolo # representa a diferença estatisticamente significativa em relação ao GCon.

Podemos observar que todos os grupos exibiram ganho significativo de massa corporal total ao longo das 8 semanas de protocolo, relacionado ao seu próprio crescimento. Apenas o GMax apresentou menor ganho de massa em relação ao GCon após 8 semanas de suplementação, representando uma redução de 10% de massa corporal total.

A massa adiposa ao final da oitava semana de suplementação foi estimada através da proporção de gordura dos epidídimos em relação à massa corporal. Esses dados estão apresentados na Figura 15.

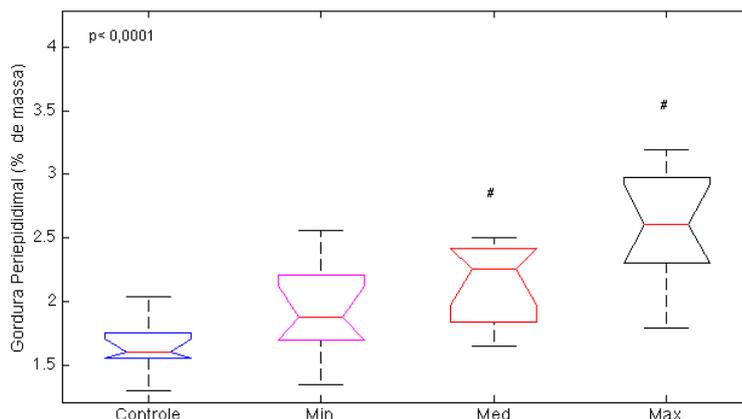


Figura 15: Proporção de gordura periepididimal em relação à massa total dos animais (gramas de gordura periepididimal/gramas de massa do rato) GCon (azul), GMin (rosa), GMed (vermelho) e GMax (preto). O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao GCon.

Todos os animais suplementados exibiram aumento na mediana da quantidade relativa de gordura periepididimal, significativo estatisticamente apenas no GMed e GMax quando comparado com o GCon.

4.1.3. Percentual de macronutrientes consumidos da dieta padrão.

A Figura 16 apresenta a quantidade de macronutrientes consumidos da ração e de lipídeos ofertados pela suplementação de óleo de arroz para os diferentes grupos de animais na 8ª semana de protocolo.

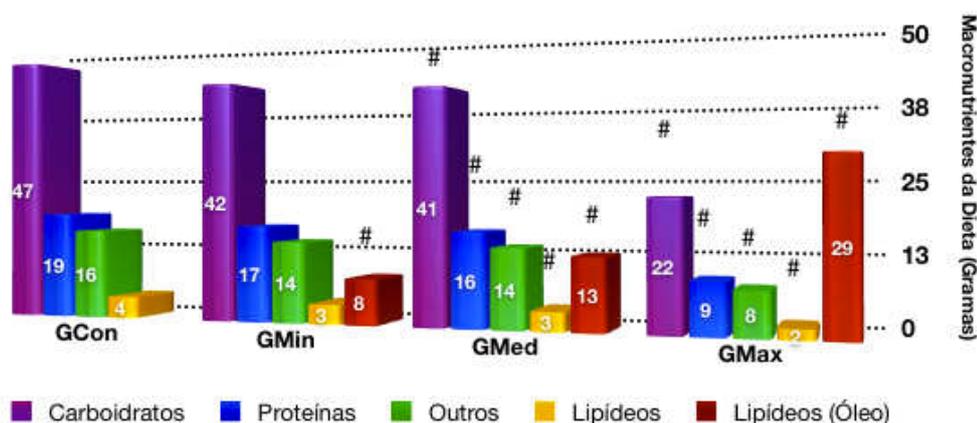


Figura 16: Macronutrientes da ração padrão consumida por todos os animais e suplementação fornecida (gramas) na 8ª semana do protocolo no GCon (dieta padrão) ou Grupo suplementado: GMin, GMed e GMax: Carboidratos (violeta), proteínas (azul), fibras e minerais, outros (verde), lipídeos da ração (amarelo), lipídeos da suplementação (vermelho). O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao GCon.

Observa-se que a dieta padrão consumida pelos animais do GCon contém cerca de 47 g de carboidratos, 19 g de proteínas, 4 g de lipídeos e 16 g de fibras e minerais. A suplementação com óleo de arroz aumentou a contribuição de lipídeos

(8 g, 13 g e 29 g) nos grupos suplementados paralelo a diminuição na quantidade de carboidratos (5 g, 6 g e 25 g) e proteínas (2 g, 3 g e 10 g) ingeridos da dieta. Note que o GMax apresentou uma redução de cerca de 52% na quantidade de proteínas e carboidratos consumidos quando comparado com o GCon.

4.1.4. Parâmetros hormonais.

A Figura 17 apresenta as concentrações séricas de leptina (A), adiponectina (B) e testosterona (C) dos animais do grupo controle e suplementados com óleo de arroz após 8 semanas de protocolo.

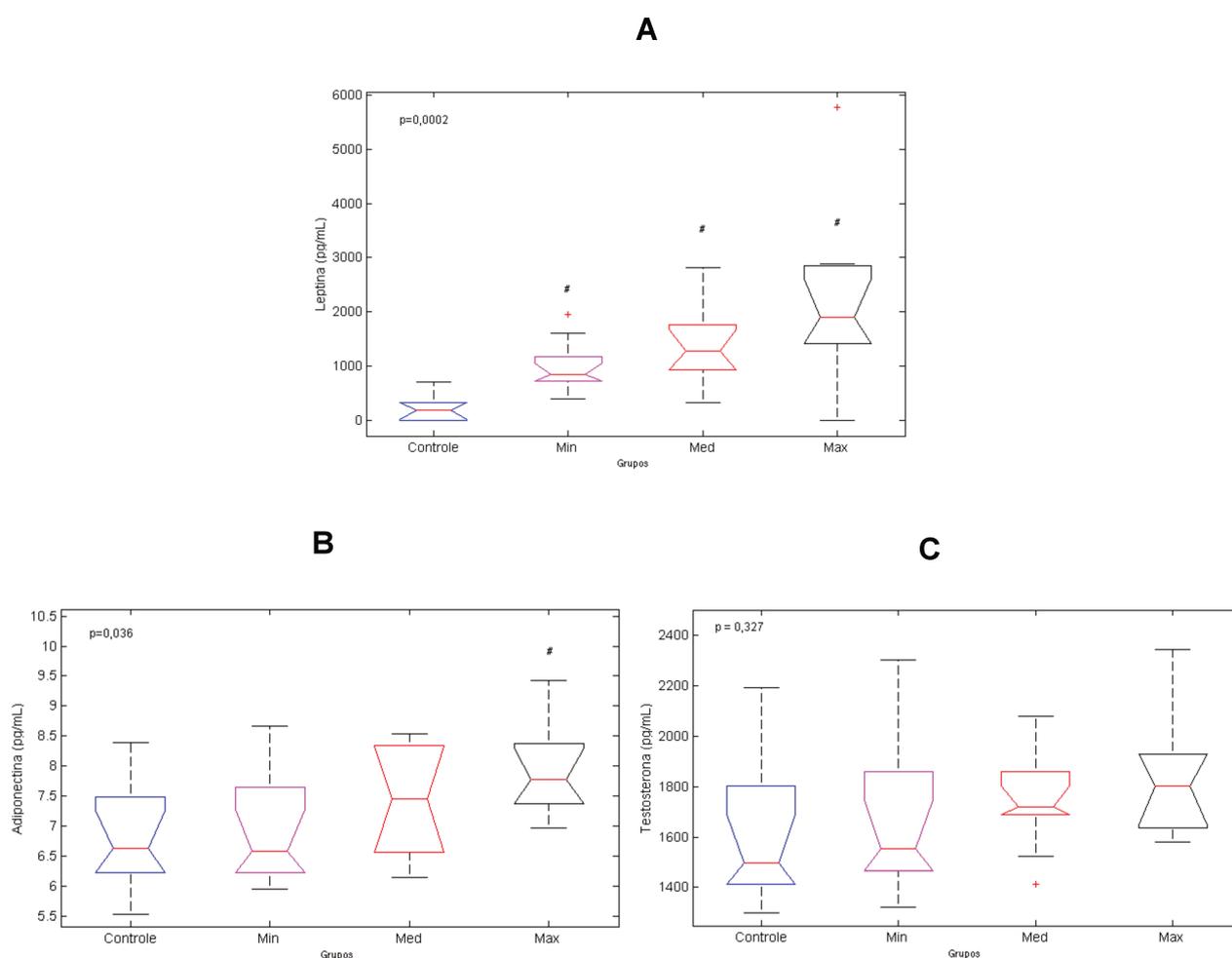


Figura 17: Concentrações séricas (pg/mL) de leptina (A), adiponectina (B) e testosterona (C) de animais sedentários no GCon (azul), GMin (rosa), GMed (vermelho) e GMax (preto).

Observa-se que ao final da oitava semana de suplementação houve um aumento das concentrações séricas de leptina significativa em todos os grupos suplementados com óleo de arroz.

Enquanto as concentrações séricas de adiponectina e testosterona apresentaram somente um aumento nos valores mínimos e na mediana dos animais

do GMed e GMax quando comparados ao GMin e GCon. Apenas as concentrações de adiponectina no grupo GMax demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação ao GCon.

4.1.5. Parâmetros bioquímicos.

A Tabela 5 apresenta os dados de perfil lipídico, glicemia e concentrações plasmáticas de ureia após 8 semanas de suplementação.

Tabela 5: Análises Bioquímicas: Perfil lipídico e concentrações de glicose e uréia após 8 semanas.

<i>Análises Bioquímicas</i>	<i>GCon</i>	<i>Suplementação de óleo de Arroz</i>			<i>p</i>
		<i>GMin</i>	<i>GMed</i>	<i>GMax</i>	
<i>Colesterol Total (mg/dL)</i>	37,15 ± 2,68	44,15 ± 4,56 ^a	40,8 ± 5,74	42,63 ± 5,32	0,0140
<i>HDL-C (mg/dL)</i>	19,84 ± 3,46	23,65 ± 2,59	22,95 ± 4,74	24,59 ± 3,35 ^a	0,0302
<i>Triglicérides (mg/dL)</i>	59 ± 33,48	66,7 ± 30,73	71,6 ± 40,33	51,2 ± 22,72	0,5242
<i>Uréia (mg/dL)</i>	37,81 ± 5,77	36,8 ± 6,36	37,38 ± 3,20	30,62 ± 4,51 ^a	0,0069
<i>Glicose (mg/dL)</i>	99,4 ± 14,20	93,2 ± 9,11	117,66 ± 14,20	115,45 ± 11,71	0,5379

Resultados apresentados em Média e Desvio padrão.

Letras representam diferença significativa quando comparado ao GCon. ^a representa diferença significativa ($p < 0,05$).

O grupo de animais GMax apresentou aumento significativo nas concentrações plasmáticas de HDL-C, acompanhado de redução significativa nas concentrações de uréia. As concentrações plasmáticas de colesterol total exibiram aumento significativo apenas no GMin, enquanto as concentrações plasmáticas de glicose e de triglicérides não se alteraram de forma significativa em nenhum dos grupos.

4.2. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no fígado dos animais.

4.2.1. Histologia.

A Figura 18 apresenta a análise qualitativa das secções de fígado de animais do GCon (A, B), GMin (C, D), GMed (E, F) e GMax (G, H) nos aumentos de 20x (A,C,E,G) e 100x (B,D,F,H) na coloração H.E. após 8 semanas de protocolo.

Observa-se que o parênquima da secção histológica dos animais do GMed e GMax apresentaram aumento da vacuolização (➡) e perda do limite celular no arranjo hepático (*). Além disso, o grupo GMax também apresentou aumento do lúmen dos sinusóides.

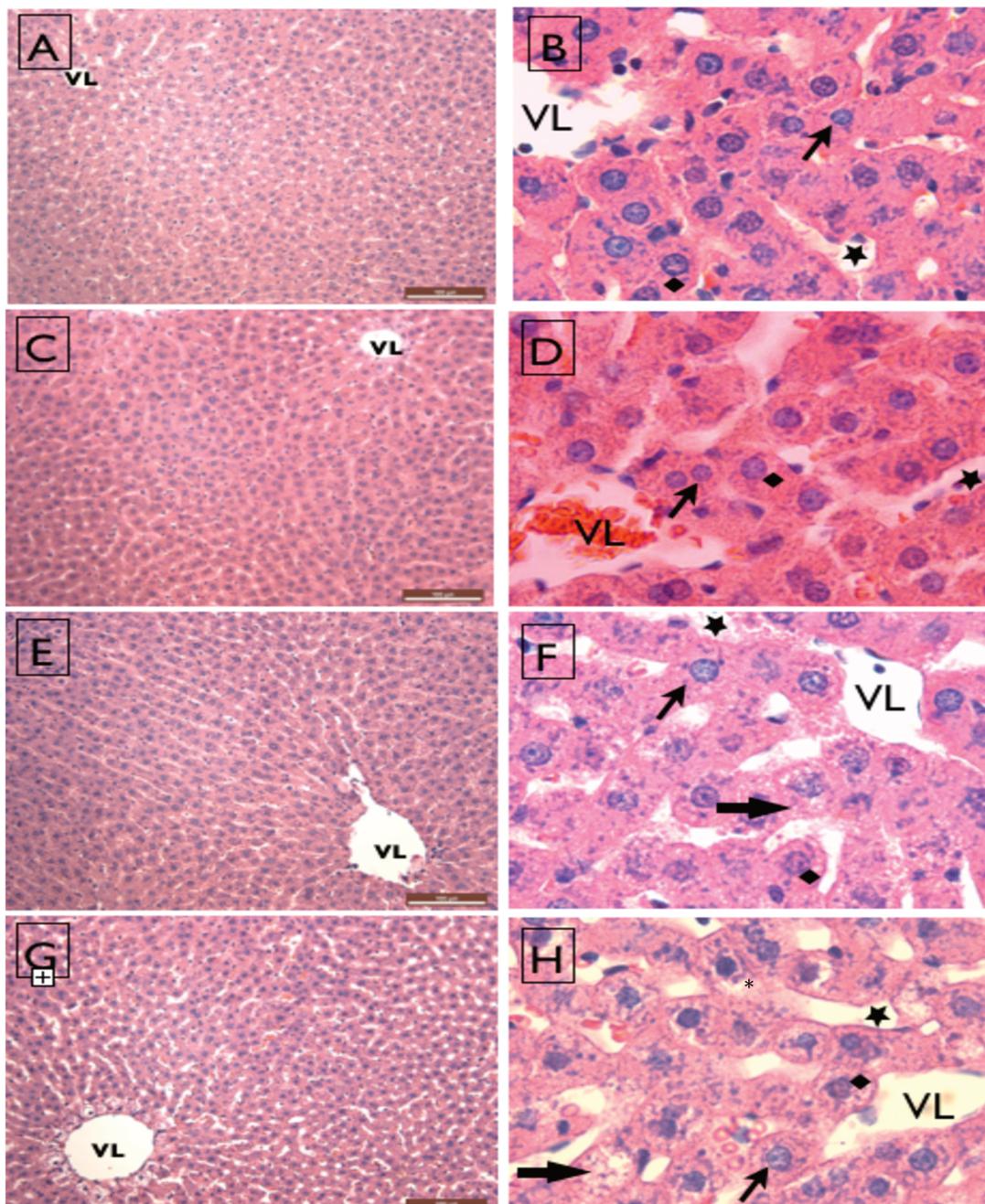


Figura 18. Secções histológicas (Coloração H.E) de fígado de ratos Wistar, GCon (A,B), GMin (C,D), GMed (E,F) e GMax (G,H).Objetiva de 20 (A,C,E,G) e 100 X (B,D,F,H).

Legenda: Veia centrolobular (VL), núcleos (→), hepatócitos/citoplasma (◆), sinusóides★), vacuolização (➡) perda do limite celular (*).

Também foram mensurados por morfometria e estereologia o diâmetro (D) e volume (Vol.) dos núcleos e hepatócitos, a porcentagem de núcleos, de citosol, de sinusóides, de veias, além de dados biométricos como o índice hepatossomático (massa do fígado/massa total do animal). Esses dados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados da morfometria e estereologia do fígado de ratos dos grupos GCon, GMin, GMed e GMax.

<i>Análise histológica</i>	<i>Suplementação de óleo de Arroz</i>				<i>p</i>
	<i>GCon</i>	<i>GMin</i>	<i>GMed</i>	<i>GMax</i>	
<i>D.nuclear (μm)</i>	6,06±0,37	6,92±0,18 ^a	6,86±0,32 ^a	6,88±1,23 ^a	<0,0001
<i>D. hepatócitos (μm)</i>	16,68±1,44	17,03±1,01	17,88 ±1,20	17,84±1,23	0,2389
<i>Vol.nuclear (μm³)</i>	117,89±20,52	173,89±14,25 ^a	170,15±23,69 ^a	171,23±17,31 ^a	<0,0001
<i>Vol. Cit. (μm³)</i>	752,18±147,25	809,58±130,7	903,98±159,03	1003,163±248,24	0,0507
<i>Vol.Hep (μm³)</i>	870,07±165,99	983,48±135,5	1074,135±175,9	1174,39±262,09 ^a	0,0286
<i>Núcleos (%)</i>	10,76±0,94	14,26 ±1,47 ^a	12,96±1,33 ^a	11,68±1,45	0,0001
<i>Citoplasma (%)</i>	68,00±2,708	65,68±3,69	68,34±2,75	66,66±3,13	0,2272
<i>Lúmen (%)</i>	18,83 ±2,89	18,02±2,93	16,27±1,80	20,46±2,95 ^b	0,0127
<i>V.centrolobular (%)</i>	2,39 ±0,94	2,04 ±1,24	2,42±1,56	2,04±0,51	0,5026
<i>HIS</i>	2,51 ±0,07	2,39±0,19	2,26±0,82	2,60±0,26	0,3138

Resultados apresentados em Média e Desvio padrão.

Letras representam diferença significativa quando comparado ao GCon. ^a representa diferença significativa p<0,05.

^b representa diferença significativa p<0,05 em relação ao GMed

Observa-se aumentos significativos no diâmetro dos núcleos e volume nuclear de todos os grupos suplementados quando comparados ao GCon. Foi observado aumento do percentual de núcleos apenas nos grupos GMin e GMed. Somente o grupo GMax apresentou aumento significativo do volume do hepatócito.

4.2.2. Marcadores de estresse oxidativo.

A Figura 19 apresenta dados relacionados ao nível de estresse oxidativo do tecido hepático em função da suplementação com doses crescentes de óleo de arroz. Para isso foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD (Figura 19A), CAT (Figura 19B), GR (Figura 19C) e TBARs (Figura 19D).

Não houve diferenças significativas (p=0,09) na atividade da enzima SOD na comparação entre os grupos suplementados e controle. No entanto, é possível notar diminuição na mediana dos dados no GMin e GMed comparado com o grupo controle e GMax.

Houve aumento significativo na atividade da enzima CAT em todos os grupos suplementados quando comparado com o GCon. A atividade no GMin aumentou em média 38% em relação ao GCon, enquanto a atividade do GMax foi aumentada em 13%.

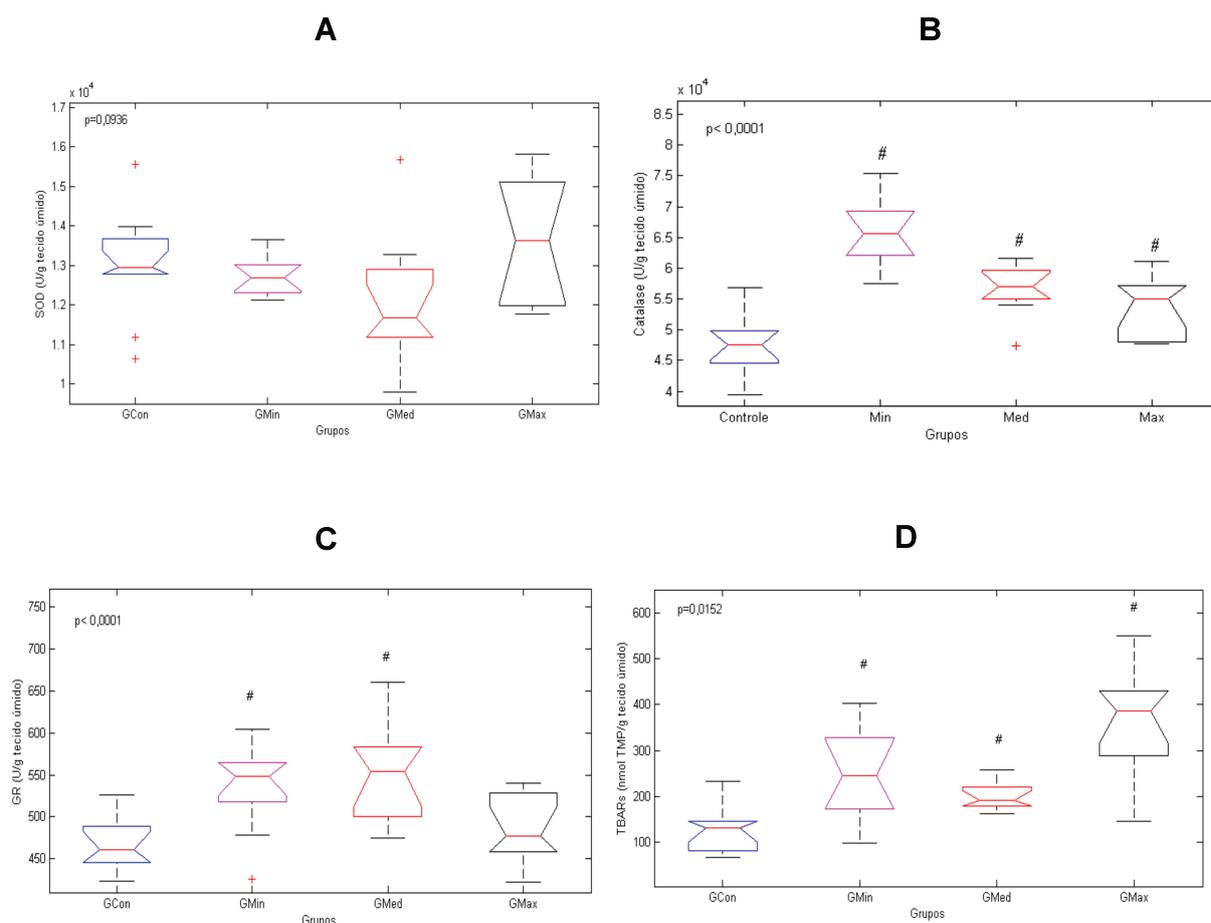


Figura 19: Atividade (unidades/gramas tecido úmido) das enzimas antioxidantes SOD(A), CAT(B) e GR(C). E Concentrações (nmol de TEP/g tecido úmido) de peróxidos lipídicos (D) no fígado do GCon (azul), GMin (rosa), GMed (vermelho) e GMax (preto) após 8 semanas de protocolo. O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao GCon.

O comportamento na atividade da enzima GR foi similar ao observado para a CAT. Atividade enzimática foi maior no grupo GMin e GMed, seguida de queda na atividade no GMax.

Já as concentrações de peróxidos de lipídeos no fígado de todos os grupos suplementados com óleo de arroz aumentaram quando comparado com o GCon. O GMax exibiu os maiores aumentos nas concentrações de TBARs.

4.2.3. Marcadores de função hepática.

A Tabela 7 apresenta as concentrações plasmáticas das enzimas AST, ALT, Fosfatase Alcalina e Amilase Pancreática após 8 semanas de suplementação com óleo de arroz.

Tabela 7: Efeitos da suplementação de óleo de arroz com nos animais do GMin, GMed e GMax comparado com os animais controle nas concentrações

<i>Análises Bioquímicas</i>	<i>Suplementação de óleo de Arroz</i>				<i>p</i>
	<i>GCon</i>	<i>GMin</i>	<i>GMed</i>	<i>GMax</i>	
<i>ALT (U/l)</i>	25,2 ± 3,5	26,43 ± 4,6	32,28 ± 5,1 ^a	31,40 ± 6,19 ^a	0,0048
<i>AST (U/l)</i>	129,8 ± 69,9	91,55 ± 17,1	148,09 ± 42,9	112,15 ± 30,8	0,1704
<i>Fosfatase Alcalina (U/l)</i>	99 ± 18,7	105,95 ± 48,8	139,84 ± 33,1	129,95 ± 35,0	0,0662
<i>Amilase Pancreática (U/l)</i>	686,3 ± 128,6	733,4 ± 75,2	843,11 ± 81,9 ^a	882,36 ± 115,2 ^a	0,0006

Resultados apresentados em Média e Desvio padrão.

Letras a representam diferença significativa $p < 0,05$ comparada ao grupo Controle.

Observa-se aumento significativo nas concentrações plasmáticas da enzima Alanina Aminotransferase (ALT) e Amilase Pancreática nos animais dos grupos GMed e GMax.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar.

Estudos recentes têm mostrado que as propriedades físicas dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais produzem diferentes efeitos no consumo alimentar e padrão de saciedade. Enquanto ácidos graxos saturados apresentam aumento no consumo de ração (Magri et al.), os com maior concentração em mono e poli-insaturados apresentam queda, ou seja, aumento da saciedade. De fato, a suplementação com óleo de arroz, fonte de ácidos graxos mono e poli-insaturados (Tabela 1) reduziu o consumo de ração nos animais do GMed e GMax quando comparados com o GCon. Embora não tenhamos encontrado outros estudos que avaliaram o efeito da suplementação de óleo de arroz no consumo de ração, outros óleos vegetais com grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados do tipo linoleico (18:2) apresentaram efeito semelhante ao encontrado no nosso trabalho. Por exemplo, a suplementação com 1 mL/kg e 2 mL de óleo de cártamo reduziu o consumo de ração quando comparado com um grupo de animais que consumiu uma dieta padrão (Campanella et al., 2014).

A diminuição no consumo de ração foi dependente da dose de óleo administrada. Ou seja, o grupo GMax produziu a maior saciedade alimentar e o grupo GMin a menor. Corroborando com esses dados, ratos e camundongos que

ingeriram 30% de ácidos graxos mono e poli-insaturados consumiram menores quantidades de ração comparado com o grupo que ingeriu 5% (Hsu e Huang, 2007; 2006).

A diminuição na quantidade de carboidratos devido a substituição pela gordura como fonte energética provavelmente foi responsável pela diminuição do consumo de ração observado no GMed e GMax. Os animais do grupo GMax, que ingeriram 9% de proteínas exibiram redução no ganho de massa corporal total e as menores concentrações plasmáticas de uréia quando comparados com o GCon, que ingeriu 19% de proteína. Nossos dados corroboram os dados obtidos por Du e colaboradores (2000) que observaram que o consumo de 2% de proteína na dieta apresentaram redução da massa corporal total, da massa magra e das concentrações plasmáticas de ureia quando comparado com o grupo que ingeriu 20% de proteínas na dieta. Esses efeitos também foram observado por Poudyal e colaboradores (2013) em animais suplementados com 1mL/kg de óleo de cártamo e animais ou pessoas com desnutrição ().

Outro dado importante desse estudo que não pode ser ignorado foi que a imposição de volumes crescentes de óleo consumidos semanalmente na dieta dos animais, e a consequente redução nos carboidratos e proteínas resultou em aumento na gordura periepídidimal dos animais, principalmente no GMed e GMax. Dietas que administraram volumes de 5, 20 e 30% de óleo de cártamo enriquecido com ácido oleico também exibiram aumento de gordura periepídidimal em função da quantidade de óleo administrada (Hsu e Huang, 2007).

Desde a descoberta da leptina está bem estabelecido em estudos com ratos e humanos que o aumento das concentrações séricas dessa adipocina é dependente do estoque de tecido adiposo branco (Zhang et al., 1994; Frederich et al., 1995a). O aumento nos níveis de leptina faz parte do *cross talking* dos adipócitos com os neurônios anorexígenos do hipotálamo sobre os níveis de energia armazenados, modulando o comportamento da ingestão de alimentos (Schwartz et al., 2000).

As altas concentrações séricas de leptina do GMax reforçam as maiores quantidades de tecido adiposo observadas, e reforçam o papel da leptina no controle da saciedade, com a consequente diminuição na ingestão de ração. Isso não significa que com altas concentrações de óleo não possa estar havendo uma possível modulação no controle da saciedade advinda dos ácidos graxos da

suplementação, ou do esvaziamento gástrico como resposta ao maior volume de óleo ingerido.

Embora o efeito anabólico natural do gama-oryzanol não tenha sido observado nas concentrações plasmáticas de testosterona, o GMax apresentou aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina quando comparado ao grupo controle. Nossa hipótese é que o aumento das concentrações de HDL encontradas no grupo GMax podem estar associadas ao aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina.

Nesse contexto, a literatura apresenta correlação positiva da adipocina com as concentrações plasmáticas de HDL (Yamamoto et al, 2002;Christou e Kiortsis, 2013). Além disso, o aumento da quantidade de gama-oryzanol ofertado na dosagem máxima pode ativar indiretamente PPAR γ , o gene de expressão da adiponectina, quando está instalado um quadro inflamatório no tecido adiposo. como observado com o óleo de milho e com o composto isolado (Ohara et al., 2009; Wang et al., 2015).

5.2. Efeitos da suplementação de óleo de arroz no fígado.

A análise das secções histológicas do fígado demonstrou um aumento da vacuolização celular, associado a perda do limite celular e aumento do volume dos hepatócitos no fígado dos animais do grupo GMax. Esses dados corroboram a outros estudos *in vitro* e *in vivo*, que observaram que o aumento da ingestão dos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico na dieta, aumentou a quantidade de microvesículas lipídicas nos hepatócitos, características de um quadro de esteatose hepática não alcoólica (Rusyn et al., 1999; Poudyal et al., 2013; Zhu et al., 2014; Anavi et al., 2015). Além das alterações morfológicas, detectamos aumento das concentrações plasmáticas das enzimas ALT, marcador de função hepática, sugerindo um possível dano hepático nos animais suplementados com altas dosagens de óleo de arroz. Corroborando com outros estudos que avaliaram dano hepático com a suplementação de óleo de palma (Owu et al., 1998) e óleo de milho (Brito et al., 2014).

No fígado, o dano tecidual pode ser decorrente de estímulos nocivos extrínsecos, como por exemplo, a oferta de ácidos graxos excedendo a capacidade de estocagem celular. Ou intrínsecos, como aumento da produção de EROs,

gerando dano oxidativo aos componentes celulares (Brookheart et al., 2009). Em ambos os casos a dieta pode ser o fator desencadeador. Abreu e colaboradores (2014) observaram que ratos Fischer que ingeriram 25% de óleo de soja (fonte de ácido graxo linoleico) com adição de 1% de colesterol exibiram aumento da vacuolização dos hepatócitos, dano hepático, aumento na produção de EROs via enzima NADPH oxidase e da peroxidação lipídica quando comparado com ratos submetidos a uma dieta padrão (Abreu et al., 2014).

Nossos dados sugerem um possível efeito lipotóxico do óleo devido ao aumento na produção de EROs no fígado dos animais suplementados. Essa hipótese é reforçada pelo aumento na atividade das enzimas antioxidantes, embora esse aumento tenha sido insuficiente para conter o aumento nos níveis de peroxidação lipídica no fígado dos animais suplementados. Esse efeito foi independente da dose utilizada.

Em nosso estudo não encontramos diferença estatisticamente significativa na atividade enzimática da SOD. Somente uma tendência de redução de atividade nos grupos GMin e GMed. Uma possível explicação para essa redução vem de pesquisas *in vitro*, que demonstraram que o aumento das concentrações de H₂O₂ na célula, produto da reação catalisada pela SOD, promovem sua inativação de forma irreversível (Blech e Borders, 1983) e degradação da enzima (Salo et al., 1988).

Vale a pena ressaltar que as enzimas CAT e GR apresentaram aumento da atividade enzimática inversamente proporcional ao nível de peroxidação lipídica observado. Ambas as enzimas apresentaram comportamento em forma de sino, com atividade máxima no GMin quando comparado ao GMed e GMax. Esse aumento da atividade das enzimas CAT e GR no GMin sugerem uma maior capacidade de neutralização das EROs produzidas, com menor dano oxidativo no grupo que ingeriu menor volume de óleo. Ao passo que a menor atividade observada no GMax sugere uma menor proteção e maior dano oxidativo as membranas celulares, proteínas, DNA e outras moléculas envolvidas no funcionamento do hepatócito. Isso também justificaria o aumento significativo das concentrações plasmáticas de ALT no grupo GMed e GMax.

Outro fator que pode estar associado a maior produção de EROs e ao dano tecidual dos hepatócitos, principalmente com as doses mais altas de óleo é a susceptibilidade ao número de insaturações dos ácidos graxos incorporados às membranas plasmáticas dos componentes celulares. Resultados de estudos *in vitro*

e *in vivo* demonstraram que a ingestão de óleos vegetais que são constituídos principalmente por ácidos graxos poli-insaturados apresentam maior susceptibilidade ao ataque de EROs e peroxidação lipídica de membranas celulares, comparado à ácidos graxos monoinsaturados e saturados. (Ergun et al., 2005; Haggag et al., 2014; Sugihara et al., 1994). Observamos nesse estudo que o aumento da peroxidação lipídica das membranas dos componentes celulares foi dependente da quantidade de óleo de arroz administrado. Esses dados sugerem que o aumento crescente da peroxidação lipídica encontrada no fígado dos animais suplementados com óleo de arroz pode estar associado ao aumento da metabolização de aldeídos reativos advindos dos ácidos graxos mono e poli-insaturados que compõe o óleo (40% ácido oleico e 34% de ácidos linoleicos).

Embora não tenhamos avaliado nenhum parâmetro histológico ou de estresse oxidativo no pâncreas também observamos aumento das concentrações plasmáticas da enzima Amilase Pancreática no GMed e GMax, sugerindo que outros tecidos podem estar prejudicados com o consumo crônico de óleo de arroz.

No nosso estudo mostramos aumento do lúmen dos sinusóides no GMax. O aumento da produção de EROs acompanhado de dano tecidual desencadeia um processo de regeneração nos hepatócitos comprometidos, que tem como passo inicial a ativação, proliferação e diferenciação de células estreladas. Quando esse processo é ativado repetidas vezes por agentes tóxicos é observado um aumento do lúmen dos sinusóides hepáticos, decorrente da maior quantidade de matriz extracelular depositada pelas células estreladas. Esse aumento foi demonstrado em animais induzidos a cirrose hepática (Matsui et al., 1994).

No fígado a leptina também pode ativar as células estreladas e contribuir para o aumento da produção de $\cdot O_2^-$, via NADPH oxidase (Ikejima et al., 2002). Além disso, a leptina também apresenta papel fundamental na proliferação dos hepatócitos. Os primeiros a observarem esse papel foi Leclercq e colaboradores (2003) que induziram um quadro de esteatose hepática em camundongos que não expressavam leptina (ob/ob) em comparação com camundongos normais. Os autores observaram que ratos ob/ob falharam em liberar citocinas inflamatórias (TNF α , IL6), ciclinas (D1) e apresentaram início tardio na primeira fase do ciclo celular, comparado ao controle e camundongos ob/ob que foram suplementados com leptina. Especulamos que o aumento das concentrações séricas de leptina

encontradas no GMed e GMax podem ter contribuído com um efeito pró inflamatório e proliferativo nos hepatócitos.

Outros estudos sugeriram que o papel proliferativo da leptina também poderia ocorrer através da ativação de fatores mitogênicos (MAPK e ERK), via receptor, independentemente de citocinas inflamatórias (Catalano et al., 2004; Frühbeck, 2006). Nossos dados não permitem maiores especulações nesse contexto. Porém, Syndor e colaboradores (2013) observaram que a remoção de 70% do lobo hepático de camundongos que ingeriram uma dieta rica em ácido graxo linoleico induziu aumento na proliferação hepática, quando comparado a uma dieta padrão (Sydor et al., 2013) e a uma dieta com ácido graxo linolênico, administrados através do óleo de peixe (Van Noorden, 1995).

Contraopondo esses dados, é importante ressaltar, que o GMax também apresentou aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina, que apresenta um papel anti-inflamatórios e anti-fibrogênico em função da redução da migração das células estreladas aos hepatócitos danificados (Ramezani-Moghadam et al., 2015), e inibição de múltiplos mecanismos pró-inflamatórios desencadeados pela leptina (Handy et al., 2011; 2010). Contudo, a razão leptina/adiponectina tende a ser maior com o aumento da dosagem do óleo e os efeitos gerados pelo aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina aparentemente não foram suficientes para reverter o quadro instalado.

O processo inflamatório também pode ser um potencial desencadeador da proliferação celular. Rusyn e colaboradores (1999) observaram que animais suplementados com 2 mL de óleo de milho aumentaram tanto as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF α) como cerca de 3 vezes a proliferação celular dos hepatócitos quando comparados com o grupo controle, sem suplementação. Como sugerido por Schmidt e Schilbler (1995) a proliferação celular pode ter alta correlação com o tamanho do núcleo, transcrição de RNA e volume citoplasmático de hepatócitos.

Em nosso estudo todos os grupos suplementados com o óleo de arroz exibiram aumento no diâmetro nuclear dos hepatócitos. Além disso, o GMin e GMed também exibiram aumento na quantidade de núcleos por secção histológica analisada, sugerindo uma cromatina desenovelada, aumento de replicação de DNA e proliferação celular (Webster et al., 2009). Resultados morfológicos dessa natureza também foram observados em fígado de animais que ingeriram hormônios

anabólicos (Mohammed et al., 2009), e em pacientes com cirrose descompensada e compensada nível II e III (Zhi-hai et al., 1995).

O conjunto de resultados apresentado nessa dissertação de mestrado proporcionou um panorama abrangente sobre os efeitos da suplementação com óleo de arroz em parâmetros que, se analisados isoladamente permitiriam interpretações equivocadas relacionadas com a recomendação do consumo de óleo de arroz na prevenção da obesidade e controle de doenças crônicas degenerativas, conforme preconizado para esse e outros óleos.

A Tabela abaixo apresenta um resumo dos efeitos de oito semanas de suplementação com diferentes doses de óleo de arroz sobre todas as variáveis analisadas.

	GMin	GMed	GMax
			
Comportamento Alimentar	↓ Consumo de Ração	↓↓ Consumo de Ração	↓↓↓ Consumo de Ração
Composição corporal	↔ Ganho de Peso ↑ G.Epididimal	↔ Ganho de Peso ↑↑ G.Epididimal	↓↓↓ Ganho de Peso ↑↑↑ G.Epididimal
Parâmetros Bioquímicos	↑ Leptina ↔ Uréia ↔ Adiponectina ↔ HDL ↔ ALT ↔ A.Pancreática	↑↑ Leptina ↔ Uréia ↑ Adiponectina ↑ HDL ↑↑ ALT ↑↑ A.Pancreática	↑↑↑ Leptina ↓↓↓ Uréia ↑↑↑ Adiponectina ↑↑↑ HDL ↑↑ ALT ↑↑ A.Pancreática
Fígado	↑↑ TBARs ↑↑↑ Catalase ↑↑ G.R ↔ SOD ↑↑ D.Núcleo ↑↑ %Núcleo ↑ V.Nuclear ↑ V.hepatócito	↑↑ TBARs ↑↑↑ Catalase ↑↑ G.R ↓ SOD ↑↑ D.Núcleo ↑↑ %Núcleo ↑ V.Nuclear ↑ V.hepatócito	↑↑↑ TBARs ↑↑ Catalase ↔ G.R ↔ SOD ↑↑ D.Núcleo ↔ %Núcleo ↑↑ V.Nuclear ↑↑ V.hepatócito

Figura 20: Panorama geral dos dados obtidos. Uma seta: Tendência de queda ou aumento. Duas setas: diferença significativa GCon. Três setas: Diferença estatisticamente significativa ao grupo controle e tendência de aumento ou redução em relação ao grupo GMin.

No contexto positivo, a suplementação com óleo de arroz induziu aumento na saciedade, redução da massa corporal e aumento nas concentrações séricas de adiponectina e HDL, principalmente nas dosagens maiores do óleo. Esses dois últimos efeitos podem ser devido a maior quantidade de gama-oryzanol, um dos componentes do óleo de arroz.

Por outro lado, outros efeitos da suplementação com óleo não se mostraram benéficos para os animais. O aumento dos estoques de tecido adiposo ao redor de

órgãos intra-abdominais como a gordura periepídídimal, da leptina sérica e os efeitos sobre o fígado não podem ser negligenciados. É importante ressaltar que todas as dosagens de óleo de arroz utilizadas induziram aumento nos níveis de estresse oxidativo associado ao dano hepático no GMed e GMax.

Provavelmente a diminuição no consumo de ração foi devido a um aporte maior de lipídeos do óleo de arroz na composição da dieta, associado a uma diminuição nas quantidades de carboidratos e proteínas que, de forma crônica gera saciedade, mas contribui também para a diminuição na massa isenta de gordura, a explicação mais provável para a diminuição na massa corporal total dos animais suplementados. Esses dados sugerem cautela com o uso crônico de óleo de arroz.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante registrar a escassez de estudos sobre os efeitos da ingestão de óleos vegetais em animais saudáveis. A maioria dos estudos sobre efeitos da ingestão de óleos são em animais que foram induzidos a desenvolver alguma doença ou alteração no perfil lipídico. Ou ainda, utilizam outro óleo como grupo controle. A comparação dos dados com um grupo controle de animais que utilizaram o mesmo volume de água permitiu identificar efeitos colaterais importantes dos ácidos graxos ofertados pelo óleo de arroz no fígado de forma dependente da dose. Esses efeitos poderiam ter sido camuflados se utilizássemos como grupo controle outro óleo vegetal.

7. APLICAÇÕES PRÁTICAS

A relação entre empresas e a universidade pode oferecer muitas vantagens para ambos os lados, uma vez que podem contribuir para o bem estar da população. Parte dos reagentes utilizados nesse estudo foi custeada pela empresa “HT Nutri”. O objetivo comum foi verificar a segurança para a comercialização do óleo de arroz como suplemento alimentar para atletas e/ou pessoas saudáveis.

Os dados contidos nessa dissertação de mestrado permitiram a sugestão de não comercialização do produto para a empresa. No entanto, a parceria entre a empresa HT Nutri e outros laboratórios da universidade resultaram na patente da reformulação do óleo (BR 10 2012 028235 6) para utilização de forma tópica para o

tratamento de úlceras na pele por induzir o aumento de fatores que aceleram o processo de cicatrização de feridas cutâneas, como a leptina, IL-2, TNF- α e IFN- γ (Lania 2013; Silva et al, 2014).

Os resultados da presente dissertação também reforçam a importância do investimento das empresas nessas parcerias. A interação da empresa com diferentes linhas de pesquisas dentro de uma universidade amplia muito o leque de opções para seu produto. O benefício final é da população.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I.C.M.E. de, Guerra, J.F.D.C., Pereira, R.R., Silva, M., Lima, W.G. de, Silva, M.E., Pedrosa, M.L., 2014. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 58, 251–259.
- Adams, D.H., Eksteen, B., 2006. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 6, 244–251. doi:10.1038/nri1784
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, in: *Oxygen Radicals in Biological Systems, Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Anavi, S., Ni, Z., Tirosh, O., Fedorova, M., 2015. Steatosis-induced proteins adducts with lipid peroxidation products and nuclear electrophilic stress in hepatocytes. *Redox Biol*. doi:10.1016/j.redox.2014.12.009
- Anderson, D., 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.* 350, 103–108.
- Bach, A.C., Babayan, V.K., 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 950–962.
- Berger, A., Rein, D., Schäfer, A., Monnard, I., Gremaud, G., Lambelet, P., Bertoli, C., 2005. Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied gamma-oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men. *Eur J Nutr* 44, 163–173. doi:10.1007/s00394-004-0508-9
- Bleeh, D.M., Borders, C.L., Jr., 1983. Hydroperoxide anion, HO₂⁻, is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,Zn superoxide dismutase: Modification of one histidine per subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 224, 579–586. doi:10.1016/0003-9861(83)90245-X
- Bortz, W., Abraham, S., Chaikoff, I.L., 1963. Localization of the block in lipogenesis resulting from feeding fat. *Journal of Biological Chemistry* 238, 1266–1272.
- Bradshaw, 1845. On the Use of Cod-Liver Oil in Chronic Rheumatism. *Prov Med Surg J* 9, 753–757.
- Brenzikofer, R.; Ribeiro, C.A. F-129: Física experimental. Campinas: IFGW, 1998. Apostila de disciplina.
- Brito, M.V.H., Costa, F.D., Vasconcelos, D.M. de, Costa, L.A.V., Yasojima, E.Y., Teixeira, R.K.C., Yamaki, V.N., 2014. Attenuation of copaiba oil in hepatic damage in rats. *Acta Cir. Bras.* 29, 776–780. doi:10.1590/S0102-86502014001900002
- Brookheart, R.T., Michel, C.I., Schaffer, J.E., 2009. As a Matter of Fat. *Cell Metabolism* 10, 9–12. doi:10.1016/j.cmet.2009.03.011
- Brown, G.C., Borutaite, V., 2012. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 12, 1–4. doi:10.1016/j.mito.2011.02.001
- Buckley, J.D., Howe, P.R.C., 2009. Anti-obesity effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Obesity reviews* 1–12. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00584.x
- Burr, G.O., Burr, M.M., 1930. On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry* 86, 587–621.
- Burr, G.O., Burr, M.M., 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry*.
- Campanella, L.C. de A., da Silva, A.C., Freygang, J., Magro, D.D.D., 2014. Efeito da suplementação de óleo de cártamo sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicídico e antioxidante de ratos wistar induzidos a obesidade. *Revista Brasileira Farmacêuticas Básica e Aplicada* 35, 141–147.

- Catalano, S., Mauro, L., Marsico, S., Giordano, C., Rizza, P., Rago, V., Montanaro, D., Maggiolini, M., Panno, M.L., Andó, S., 2004. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19908–19915. doi:10.1074/jbc.M313191200
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* 157, 1–11. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.*
- Christou, G.A., Kiortsis, D.N., 2013. Adiponectin and lipoprotein metabolism. *Obesity reviews* 14, 939–949. doi:10.1111/obr.12064
- Cichoż-Lach, H., Michalak, A., 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 20, 8082–8091. doi:10.3748/wjg.v20.i25.8082
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295. doi:10.1056/NEJM199602013340503
- Crosas-Molist, E., Fabregat, I., 2015. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis. *Redox Biol* 6, 106–111. doi:10.1016/j.redox.2015.07.005
- Day, C.P., 2002. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 16, 663–678.
- Du, F, D A Higginbotham, and B D White. 2000. 'Food Intake, Energy Balance and Serum Leptin Concentrations in Rats Fed Low-Protein Diets.', *The Journal of Nutrition*, 130: 514–21
- Eady, S., Wallace, A., Willis, J., Scott, R., Frampton, C., 2011. Consumption of a plant sterol-based spread derived from rice bran oil is effective at reducing plasma lipid levels in mildly hypercholesterolaemic individuals. *Br. J. Nutr.* 105, 1808–1818. doi:10.1017/S0007114510005519
- Eaton, S.B., Cordain, L., 1997. Evolutionary aspects of diet: old genes, new fuels. *Nutritional changes since agriculture.* *World Rev Nutr Diet* 81, 26–37.
- Enerbäck, S., 2013. Adipose tissue metabolism in 2012: Adipose tissue plasticity and new therapeutic targets. *Nature Reviews Endocrinology* 9, 69–70. doi:10.1038/nrendo.2012.242
- Ergun, S., Yontem, M., Yerlikaya, A., Ozata, A., Uysal, K., Kurt, H., 2005. Influence of dietary oils on liver and blood lipid peroxidation. *Saudi Medical Journal* 26, 442–446.
- Eslami, S., Esa, N.M., Marandi, S.M., Ghasemi, G., Eslami, S., 2014. Effects of gamma oryzanol supplementation on anthropometric measurements & muscular strength in healthy males following chronic resistance training. *Indian J. Med. Res.* 139, 857–863.
- Fickova, M, P Hubert, G Crémel, and C Leray. 1998. 'Dietary (N-3) and (N-6) Polyunsaturated Fatty Acids Rapidly Modify Fatty Acid Composition and Insulin Effects in Rat Adipocytes.', *The Journal of Nutrition*, 128 (American Society for Nutrition): 512–19
- Flick, P.K., Chen, J., Vagelos, P.R., 1977. Effect of dietary linoleate on synthesis and degradation of fatty acid synthetase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 252, 4242–4249.
- Foufelle, f., Perdereau, d., Gouhot, b., Ferre, p., Girard, J., 1992. Effect of diets rich in medium-chain and long-chain triglycerides on lipogenic-enzyme gene expression in liver and adipose tissue of the weaned rat. *European Journal of Biochemistry* 208, 381–387.
- Food and Drug Administration. 2005. *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers* (Center for Drug Evaluation and Research (CDER))
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Lollmann, B., Lowell, B.B., Flier, J.S., 1995a. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine* 1, 1311–1314. doi:10.1038/nm1295-1311
- Frederich, R.C., Löllmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B., Flier, J.S., 1995b. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J. Clin. Invest.* 96, 1658–1663. doi:10.1172/JCI118206
- Frühbeck, G., 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal* 393, 7–20. doi:10.1042/BJ20051578
- Fry, A.C., Bonner, E., Lewis, D.L., Johnson, R.L., Stone, M.H., Kraemer, W.J., 1997. The effects of gamma-oryzanol supplementation during resistance exercise training. *International Journal of Sports Nutrition* 1–13.
- Gandra, P.G., de Macedo, D.V., Alves, A.A., 2006. Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício. *Revista de Ensino de Bioquímica* 4, 23–33.

- doi:10.16923/reb.v4i2.25
- Ghorbel, I., Elwej, A., Jamoussi, K., Boudawara, T., Kamoun, N.G., Zeghal, N., 2015. Potential protective effects of extra virgin olive oil on the hepatotoxicity induced by co-exposure of adult rats to acrylamide and aluminum. *Food Funct.* 6, 1126–1135. doi:10.1039/C4FO01128G
- Goodhart, J.F., 1892. Remarks on Gall Stones and on their Treatment by the Administration of Large Doses of Olive Oil. *Br Med J* 1, 219–222.
- Haggag, M.E.-S.Y.E.-S., Elsanhoty, R.M., Ramadan, M.F., 2014. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 4, 52–58. doi:10.1016/S2221-1691(14)60208-2
- Halliwell, B., 2001. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Science* 1–7.
- Handy, J.A., Fu, P.P., Kumar, P., Mells, J.E., Sharma, S., Saxena, N.K., Anania, F.A., 2011. Adiponectin inhibits leptin signalling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis. *Biochem. J.* 440, 385–395. doi:10.1042/BJ20102148
- Handy, J.A., Saxena, N.K., Fu, P., Lin, S., Mells, J.E., Gupta, N.A., Anania, F.A., 2010. Adiponectin activation of AMPK disrupts leptin-mediated hepatic fibrosis via suppressors of cytokine signaling (SOCS-3). *Journal of Cellular Biochemistry* 110, 1195–1207. doi:10.1002/jcb.22634
- Hassan, M., Latif, N., Yacoub, M., 2012. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol* 9, 689–702. doi:10.1038/nrcardio.2012.148
- Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., DiLeone, R.J., 2006. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51, 801–810. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.023
- Hopkins, W.G., 2000. Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Med* 30, 1–15.
- Hsu, S.-C., Huang, C.-J., 2007. Changes in liver PPAR α mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *J. Nutr. Biochem.* 18, 86–96. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.03.003
- Hsu, S.-C., Huang, C.-J., 2006. Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms 1–7.
- Hyun, S.A., Vahouny, V., Treadwell, C.R., 1967. Portal absorption of fatty acids in lymph- and portal vein-cannulated rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 137, 296–305.
- Ikejima, K., Takei, Y., Honda, H., Hirose, M., Yoshikawa, M., Zhang, Y.-J., Lang, T., Fukuda, T., Yamashina, S., Kitamura, T., Sato, N., 2002. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 122, 1399–1410.
- Ismail, Maznah, Ghanya Al-Naqeeb, Wan Abd Aziz Bin Mamat, and Zalinah Ahmad. 2010. 'Gamma-Oryzanol Rich Fraction Regulates the Expression of Antioxidant and Oxidative Stress Related Genes in Stressed Rat's Liver.', *Nutrition & Metabolism*, 7: 23
- Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., 2008. *Histologia básica*.
- Kennedy, A., Menon, S.D., Suneetha, E., 2010. Study on Effect of Rice bran & sunflower oil blend on Human Lipid profile. *Indian J. Applied Pure Bio.* 25, 375–384.
- Kenny, P.J., 2011. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 638–651. doi:10.1038/nrn3105
- Kim, S.J., Han, D., Moon, K.D., Rhee, J.S., 1995. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 59, 822–826. doi:10.1271/bbb.59.822
- Kinsell, L.W., Michaels, G.D., Wheeler, P., Flynn, P.F., Walker, G., 1958. Essential fatty acids and the problem of atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 6, 628–631.
- Konstantinov, I.E., Mejevoi, N., Anichkov, N.M., 2006. Nikolai N. Anichkov and his theory of atherosclerosis., *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital.* Texas Heart Institute.
- Kuriyan, R., Gopinath, N., Mario, V., Kurpad, A.V., 2005. Use of rice bran oil in patients with hyperlipidaemia. *Natl Med J India* 18, 1–5.
- Lania, Bruno Grosselli. 2013. 'Uso Do Óleo De Arroz Na Cicatrização De Úlceras Cutâneas Em Ratos (Rattus Norvegicus Albinus)' Tese (Mestrado em Clínica Médica)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Leclercq, I.A., Field, J., Farrell, G.C., 2003. Leptin-specific mechanisms for impaired liver regeneration in ob/ob mice after toxic injury. *Gastroenterology* 124, 1451–1464.
- Lee, Y., Wang, M.Y., Kakuma, T., Wang, Z.W., Babcock, E., McCorkle, K., Higa, M., Zhou, Y.T., Unger, R.H., 2001. Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. *J. Biol. Chem.* 276, 5629–5635. doi:10.1074/jbc.M008553200
- Machado, E.F.A., Normand, A.C.R., Nunes, L.A.S., Brenzikofer, R., Macedo, D.V., 2009. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in

- rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 1035–1038.
- Marzzoco, A., Torres, B.B., 2007. *Bioquímica básica*.
- Matsui, Y., Okuda, Y., Nakagawa, M., Kwon, A.H., Minoura, T., Hiramatsu, Y., Uetsuji, S., Kamiyama, Y., 1994. Effect of hepatocyte volume on energy status in the cirrhotic rat liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9, 613–619.
- Mäkynen, K., Chitchumroonchokchai, C., Adisakwattana, S., Failla, M., Ariyapitipun, T., 2012. Effect of gamma-oryzanol on the bioaccessibility and synthesis of cholesterol. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16, 49–56.
- McDonald, G.B., Saunders, D.R., Weidman, M., Fisher, L., 1980. Portal venous transport of long-chain fatty acids absorbed from rat intestine. *Am. J. Physiol.* 239, G141–50.
- McDonald, G.B., Weidman, M., 1987. Partitioning of polar fatty acids into lymph and portal vein after intestinal absorption in the rat. *Q J Exp Physiol* 72, 153–159.
- McGill, R, J W Tukey, and W A Larsen. 1978. 'Variations of Box Plots', *The American Statistician*, 32: 12–16
- Mello, L.D., Alves, A.A., Macedo, D.V., Kubota, L.T., 2005. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chemistry* 92, 515–519. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.019
- Mercer, S.W., Trayhurn, P., 1987. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J. Nutr.* 117, 2147–2153.
- Minhajuddin, M., Beg, Z.H., Iqbal, J., 2005. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food and chemical toxicology*. doi:10.1016/j.fct.2005.01.015
- Miranda, A., Fraga, C., Monge, A., Ganellin, C.R., 2006. Atividade Seqüestradora de Radical Livre Determinação do Potencial Antioxidante de Substâncias Bioativas. *Practical Studies for Medicinal*
- Mohammed, T.T., Hasso, A.R., Al-Sarraj, A., 2009. Morphometrical analysis of liver hepatocyte in rabbits treated with nandrolone decanoate: part two. *The medical Journal of Basrah University* 27, 23–27.
- Nagasaka, R., Yamsaki, T., Uchida, A., Ohara, K., Ushio, H., 2011. γ -Oryzanol recovers mouse hypoadiponectinemia induced by animal fat ingestion. *Phytomedicine* 18, 669–671. doi:10.1016/j.phymed.2011.01.004
- Nannipieri, M., Bonotti, A., Anselmino, M., Cecchetti, F., Madec, S., Mancini, E., Baldi, S., Santini, F., Pinchera, A., Rossi, M., Ferrannini, E., 2007. Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state. *Int J Obes (Lond)* 31, 1843–1848. doi:10.1038/sj.ijo.0803676
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Lehninger : principios de bioquímica*.
- Odena, G., Bataller, R., 2012. Actin-binding proteins as molecular targets to modulate hepatic stellate cell proliferation. Focus on "MARCKS actin-binding capacity mediates actin filament assembly during mitosis in human hepatic stellate cells". *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 303, C355–6. doi:10.1152/ajpcell.00192.2012
- Ohara, K., Uchida, A., Nagasaka, R., Ushio, H., Ohshima, T., 2009. The effects of hydroxycinnamic acid derivatives on adiponectin secretion. *Phytomedicine* 16, 130–137.
- Ohkawa, Hiroshi, Nobuko Ohishi, and Kunio Yagi. 1979. 'Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction', *Analytical Biochemistry*, 95 (Academic Press): 351–58
- Okuno, M., Kajiwara, K., Imai, S., Kobayashi, T., Honma, N., Maki, T., Suruga, K., Goda, T., Takase, S., Muto, Y., Moriwaki, H., 1997. Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 127, 1752–1757.
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* 11, 85–97. doi:10.1038/nri2921
- Owu, D.U., Osim, E.E., Ebong, P.E., 1998. Serum liver enzymes profile of Wistar rats following chronic consumption of fresh or oxidized palm oil diets. *Acta Tropica* 69, 65–73. doi:10.1016/S0001-706X(97)00115-0
- Paik, Y.-H., Kim, J., Aoyama, T., De Minicis, S., Bataller, R., Brenner, D.A., 2014. Role of NADPH Oxidases in Liver Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 2854–2872. doi:10.1089/ars.2013.5619
- Paucar-Menacho, L M, and L H Silva. 2007. 'Refino De Óleo De Farelo De Arroz (Oryza Sativa L.) Em Condições Brandas Para Preservação Do γ -Orizanol', *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*: 45–53
- Piomelli, D., 2013. A fatty gut feeling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24, 332–341. doi:10.1016/j.tem.2013.03.001
- Posuwan, J., Prangthip, P., Leardkamolkarn, V., Yamborisut, U., Surasiang, R., Charoensiri, R.,

- Kongkachuichai, R., 2013. Long-term supplementation of high pigmented rice bran oil (*Oryza sativa* L.) on amelioration of oxidative stress and histological changes in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet; Riceberry bran oil. *Food Chemistry* 138, 501–508. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.144
- Poudyal, H., Kumar, S.A., Iyer, A., Waanders, J., Ward, L.C., Brown, L., 2013. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1381–1392. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.11.006
- Purushothama, S., Raina, P.L., Hariharan, K., 1995. Effect of long term feeding of rice bran oil upon lipids and lipoproteins in rats. *Mol Cell Biochem* 146, 63–69. doi:10.1007/BF00926883
- Raclot, T., Oudart, H., 1999. Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 633–646. doi:10.1017/S002966519900083X
- Rader, D.J., Cohen, J., Hobbs, H.H., 2003. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J. Clin. Invest.* 111, 1795–1803. doi:10.1172/JCI18925
- Raghuram, T.C., BRAHMAJI RAO, U., Rukmini, C., 1989. Studies on hypolipidemic effects of dietary rice bran oil in human subjects. *Nutrition reports international* 39, 889–895.
- Ramezani-Moghadam, M., Wang, J., Ho, V., Iseli, T.J., Alzahrani, B., Xu, A., Van der Poorten, D., Qiao, L., George, J., Hebbard, L., 2015. Adiponectin reduces hepatic stellate cell migration by promoting tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) secretion. *J. Biol. Chem.* 290, 5533–5542. doi:10.1074/jbc.M114.598011
- Rana, P., Vadhera, S., Soni, G., 2004. In vivo antioxidant potential of rice bran oil (RBO) in albino rats. *Indian Journal Physiol Pharmacol* 48, 428–436.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661. doi:10.1096/fj.07-9574LSF
- Reena, M.B., Lokesh, B.R., 2007. Hypolipidemic effect of oils with balanced amounts of fatty acids obtained by blending and interesterification of coconut oil with rice bran oil or sesame oil. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10461–10469. doi:10.1021/jf0718042
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., Blüher, M., 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 8665–8670. doi:10.1073/pnas.0903485106
- Rong, N., Ausman, L.M., Nicolosi, R.J., 1997. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* 32, 303–309.
- Rukmini, C., 1988. Chemical, nutritional and toxicological studies of rice bran oil. *Food Chemistry* 30, 257–268. doi:10.1016/0308-8146(88)90112-4
- Rusyn, I., Bradham, C.A., Cohn, L., Schoonhoven, R., Swenberg, J.A., Brenner, D.A., Thurman, R.G., 1999. Corn oil rapidly activates nuclear factor-Kb in hepatic Kupffer cells by oxidant-dependent mechanisms. *Carcinogenesis* 20, 2095–2100.
- Rutkowski, J.M., Stern, J.H., Scherer, P.E., 2015. Beyond the cell: The cell biology of fat expansion. *The Journal of Cell Biology* 208, 501–512. doi:10.1083/jcb.201409063
- Sabine, J.R., McGrath, H., Abraham, S., 1969. Dietary Fat and the Inhibition of Hepatic Lipogenesis in the Mouse. *J. Nutr.* 98, 312–318.
- Salo, D C, S W Lin, R E Pacifici, and KJA Davies. 1988. 'Superoxide Dismutase Is Preferentially Degraded by a Proteolytic System From Red Blood Cells Following Oxidative Modification by Hydrogen Peroxide', *Free Radical Biology and Medicine*
- Schmidt, E.E., Schibler, U., 1995. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *The Journal of Cell Biology* 128, 467–483.
- Schroyen, B., Guimarães, E.L., Dollé, L., Coulon, S., Empsen, C., Nyssen, M., Geerts, A., Colle, I., Geerts, A., van Grunsven, L.A., 2012. Leptin-mediated reactive oxygen species production does not significantly affect primary mouse hepatocyte functions in vitro. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24, 1370–1380. doi:10.1097/MEG.0b013e328357ce1c
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature.* doi:10.1038/35007534
- Seetharamaiah, G.S., Chandrasekhara, N., 1989. Studies on hypocholesterolemic activity of rice bran oil. *Atherosclerosis* 78, 219–223. doi:10.1016/0021-9150(89)90226-8
- Sharma, R.D., Rukmini, C., 1986. Rice bran oil and hypocholesterolemia in rats. *Lipids.*
- Simopoulos, A.P., 2001. Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease. *European Heart Journal-Supplements.*
- Silva, m. n. ; Lania, b.g. ; Velho, penf . O uso do óleo de arroz na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos. In: V Congresso Brasileiro de Enfermagem em Dermatologia, 2014, Búzios.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of Glutathione Reductase in crude Tissue

- homogenates using 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) 1–6.
- Sugano, M., Tsuji, E., 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J. Nutr.* 127, 521S–524S.
- Sugihara, N, Y Tsuruta, Y Date, K Furuno, and K Kohashi. 1994. 'High Peroxidative Susceptibility of Fish Oil Polyunsaturated Fatty Acid in Cultured Rat Hepatocytes.', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 126: 124–28 <<http://dx.doi.org/10.1006/taap.1994.1098>>
- Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S., 2003. Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- γ function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nature Cell Biology* 5, 224–230. doi:10.1038/ncb942
- Sydor, S., Gu, Y., Schlattjan, M., Bechmann, L.P., Rauen, U., Best, J., Paul, A., Baba, H.A., Sowa, J.-P., Gerken, G., Canbay, A., 2013. Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab. Invest.* 93, 20–30. doi:10.1038/labinvest.2012.142
- Tian, L., Cai, Q., Wei, H., 1998. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 1477–1484.
- Tyroler, H.A., 2000. Coronary heart disease epidemiology in the 21st century. *Epidemiol Rev* 22, 7–13.
- Uchiyama, Mitsuru, and Midori Mihara. 1978. 'Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test', *Analytical Biochemistry*, 86: 271–78
- Unger, R.H., 2003. The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 333–347. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142622
- Van Noorden, C J. 1995. 'Effects of N-3 and N-6 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Diets on Lipid Metabolism in Periportal and Pericentral Compartments of Female Rat Liver Lobules and the Consequences for Cell Proliferation After Partial Hepatectomy.', *Journal of Lipid Research*, 36: 1708–20
- Wang, O., Liu, J., Cheng, Q., Guo, X., Wang, Y., Zhao, L., Zhou, F., Ji, B., 2015. Effects of Ferulic Acid and γ -Oryzanol on High-Fat and High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *PLoS ONE* 10, e0118135–14. doi:10.1371/journal.pone.0118135
- Webster, M., Witkin, K.L., Cohen-Fix, O., 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell. Sci.* 122, 1477–1486. doi:10.1242/jcs.037333
- Weibel, E R. 1981. 'Stereological Methods in Cell Biology: Where Are We--Where Are We Going?', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 29: 1043–52
- Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Woolfrey, B., Kritchevsky, D., 2007. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. *J. Nutr. Biochem.* 18, 105–112. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.03.006
- Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E., Vermoesen, A.N., 1996. Structure and Function of Sinusoidal Lining Cells in the Liver. *Toxicologic Pathology* 24, 100–111. doi:10.1177/019262339602400114
- Xu, Z., Samuel, G., 1999. Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in RiceBran Oil 1–5.
- Yamamoto, Yukihiro, Hiroshi Hirose, Ikuo SAITO, Motowo Tomita, Matsuo Taniyama, and others. 2002. 'Correlation of the Adipocyte-Derived Protein Adiponectin with Insulin Resistance Index and Serum High-Density Lipoprotein-Cholesterol, Independent of Body Mass Index, in the Japanese Population', *Clinical Science*, 103: 137–42
- Zámbó, Veronika, Laura Simon-Szabó, Péter Szelényi, Eva Kereszturi, Gábor Bánhegyi, and others. 2013. 'Lipotoxicity in the Liver.', *World Journal of Hepatology*, 5: 550–57
- Zavoshy, R., Noroozi, M., Jahanihashemi, H., 2012. Effect of low calorie diet with rice bran oil on cardiovascular risk factors in hyperlipidemic patients. *J Res Med Sci* 17, 626–631.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zhi-hai, P., Hua-mei, T., Ke-zhong, M., Zhi-ben, D., 1995. The relationship between the morphology of nucleus of liver cells and the liver functions and prognosis of portal hypertension due to hepatic cirrhosis. *Journal of Tongji Medical University* 15, 104–107.
- Zhu, Chunyan, Ping Xie, Fei Zhao, Lingqiang Zhang, Wei An, and others. 2014. 'Mechanism of the Promotion of Steatotic HepG2 Cell Apoptosis by Cholesterol.', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7: 6807–13
- Zhu, R., Wang, Y., Zhang, L., Guo, Q., 2012. Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research* 42, 741–749.

ANEXO I

Avaliação “*in vitro*” da capacidade antioxidante do óleo de arroz.

A capacidade antioxidante do óleo de arroz foi mensurada através da sua capacidade em reduzir (sequestrar) o radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A Tabela 8 apresenta a média da capacidade sequestradora dos antioxidante (%AS) do óleo de arroz utilizado na gavagem dos animais ao longo do protocolo.

Tabela 8: Percentual da atividade sequestradora (%AS) de 4,6 mg/mL de óleo de arroz.

	1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana	5 ^a semana	6 ^a semana	7 ^a semana	8 ^a semana	p
% AS	34,8 ± 6,2	41,8 ± 5,3	37,4 ± 7,5	34,4 ± 14,4	35,8 ± 3,1	34,2 ± 13,0	34,9 ± 7,2	28,8 ± 4,1	0,542

Resultados apresentados em Média e Desvio Padrão.

A estabilidade dos antioxidantes do óleo mostrou uma variabilidade de 29% a 42% da atividade sequestradora total de DPPH. Porém, essa diferença no %AS do óleo de arroz utilizado ao longo das 8 semanas do protocolo não foi estatisticamente significativa.

ANEXO II

PADRONIZAÇÕES, ANÁLISE DE CONFIANÇA E DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS

A busca por respostas que expliquem o funcionamento dos fenômenos da natureza é de caráter milenar e inato do ser humano. Inicialmente os conhecimentos gerados tinham como base apenas os aspectos da observação e da lógica. Contudo, após o século XVII Galileu Galilei se contrapôs a seus antecessores e propôs um método de investigação denominado de método científico, que confrontava os conhecimentos teóricos existentes com evidências laboratoriais manifestadas e avaliadas de forma que traga mais confiabilidade aos resultados (Brenzikofer, 1997).

Os métodos experimentais utilizados para mensuração dos fenômenos de interesse dessa dissertação foram quantificados de forma indireta. Para isso foi necessária a etapa de padronização das técnicas utilizadas para maior confiabilidade dos resultados obtidos e das interpretações realizadas. As padronizações dos métodos utilizados nessa dissertação foram realizadas e a condição experimental foi selecionada através de curvas-padrão. A curva padrão são correlações entre retas de uma variável dependente (eixo x) e uma variável independente (eixo y). A mudança de comportamento entre essas duas variáveis determinam sua linearidade. Assim quanto mais linear uma curva mais próxima de uma correlação de 1 ou -1, enquanto mais próximo de 0 (zero) menor sua linearidade. Assim, escolhemos as curvas que apresentaram maior linearidade, a fim de garantir que tanto o aumento quanto diminuição da atividade das enzimas seja detectado nos ensaios espectrofotométricos realizados com os grupos experimentais do protocolo.

Uma das formas de se avaliar o estresse oxidativo nos tecidos é através das concentrações de TBARs e da atividade das enzimas antioxidantes. Sabendo-se que o nível de substrato e produto interferem nas reações químicas e enzimáticas realizamos diversas curvas-padrão com diferentes volumes de amostra, tratados como média e desvio padrão. Quando o desvio padrão de uma medida é expresso em porcentagem é denominado de coeficiente de variação (CV). E pode ser obtido através da divisão do desvio padrão pela média dos dados e multiplicado por 100. Assim, quanto menor CV de uma amostra mais homogêneo serão os dados obtidos da triplicada, permitindo uma maior confiabilidade dos dados obtidos (Hopkins, 2000).

As condições experimentais foram selecionadas de curvas que apresentaram variabilidade menor que 5%.

Além de garantir maior confiabilidade e reprodutibilidade dos métodos as padronizações permitem que o aprendiz se familiarize com os métodos a serem desenvolvidos ao longo de sua busca por respostas aos fenômenos investigados. Abaixo são apresentadas as curvas com diferentes tempos de leitura, volumes de amostra utilizado, correlação e CV das triplicatas da padronização das enzimas antioxidantes e concentração de TBARs, bem como o volume e tempo escolhido.

A.I. Espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

Abaixo demonstramos duas tentativas da realização das curvas-padrão do método TBARs (A e B) e a curva padrão com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) – (C).

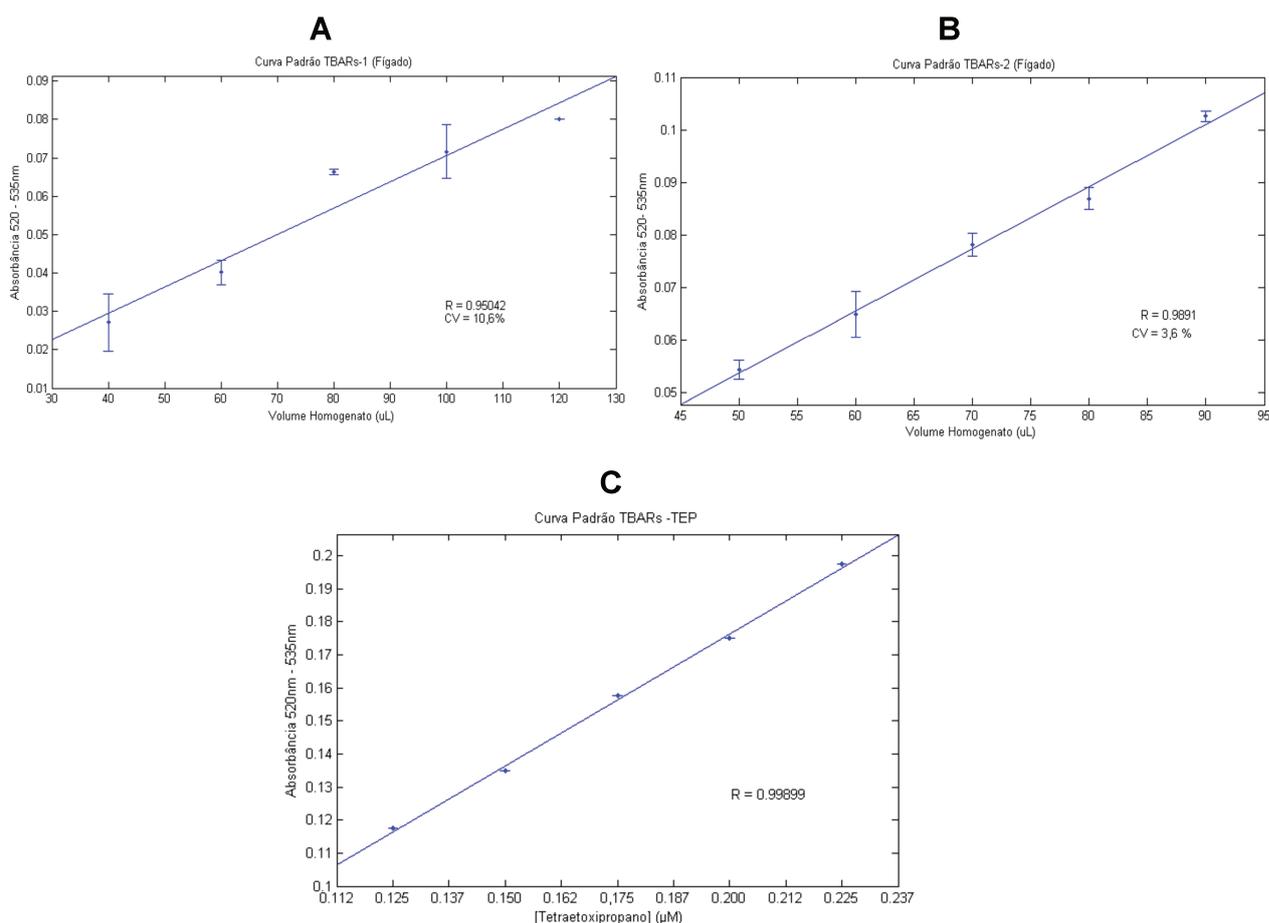


Figura 1: Curva-padrão diferentes volumes de homogenato para o método TBARs. Primeira (A) e segunda (B) tentativa de padronização com diferentes volumes de homogenato (µL). E uma curva padrão (C) com diferentes concentrações de TEP.

Como podemos observar a primeira tentativa de padronização (A) apresentou uma baixa correlação de 0.95 e alta variabilidade dos dados (CV: 10,6%). Os volumes

testados na segunda tentativa (B) exibiram melhor linearidade ($R:0,989$) e menor variabilidade dos dados (3,6%). Nesse sentido, escolhemos as condições experimentais da curva B, com o volume de 50uL de amostra para realizar as leituras dos grupos experimentais.

A partir da curva padrão do TEP (C) foi possível calcular as concentrações de TBARs do ensaio. O cálculo foi realizado a partir dos valores de coeficiente linear e angular da equação da reta ($y=ax+b$). Onde, a é o coeficiente angular e b o linear e y a absorbância conhecidas de TEP. Esses dados foram relativizados pela massa de tecido úmido, tendo como produto final da equação $x= \text{nmol/g tecido úmido}$.

A.II. Catalase

Para a enzima Catalase no fígado, utilizamos os volumes de 50,70,90,110,130 e 150 μL e o tempo de leitura realizado com 30(A),60(B),90(C) e 120(D) segundos reação. Outras curvas também foram realizadas, porém demonstramos aqui apenas a escolhida.

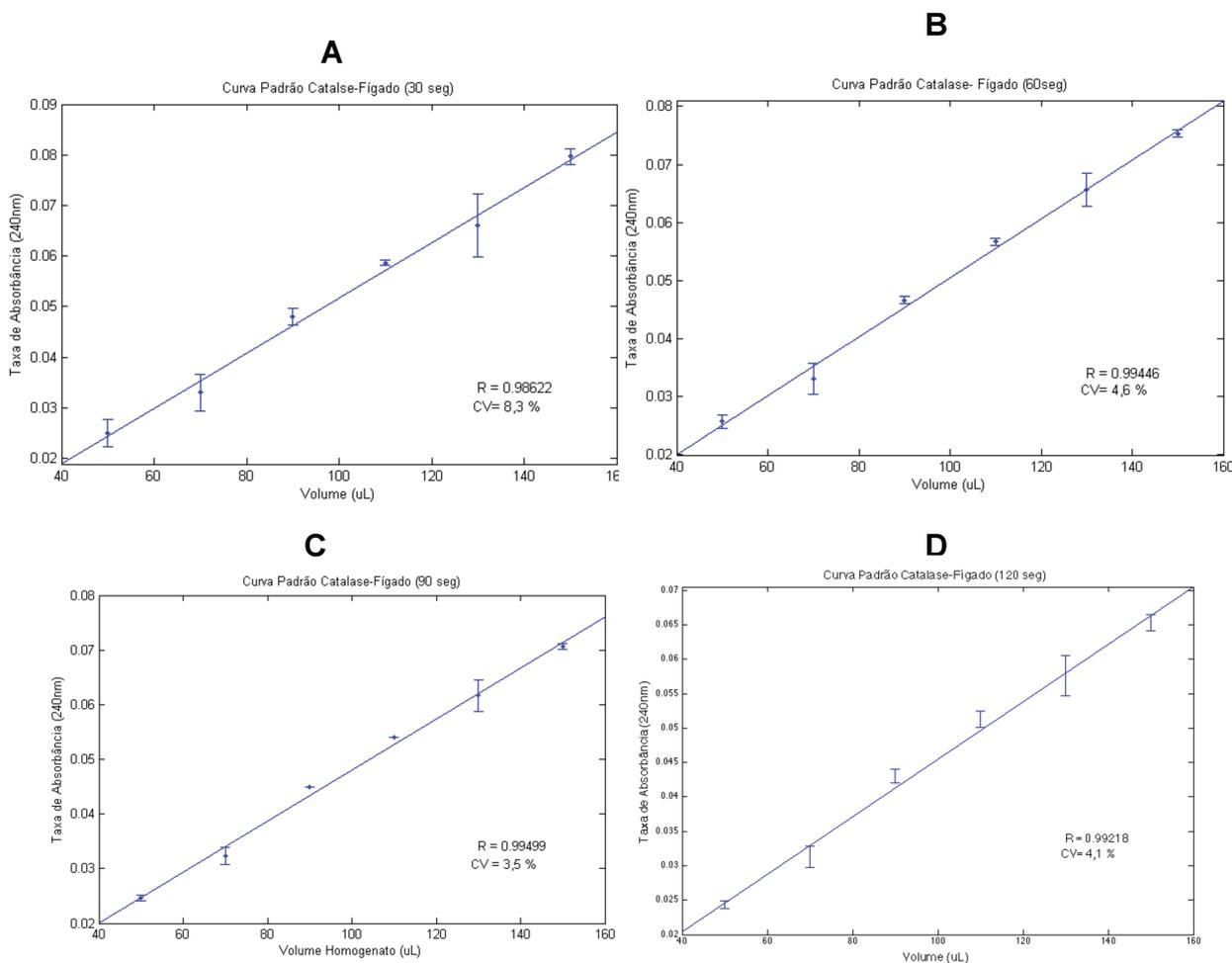
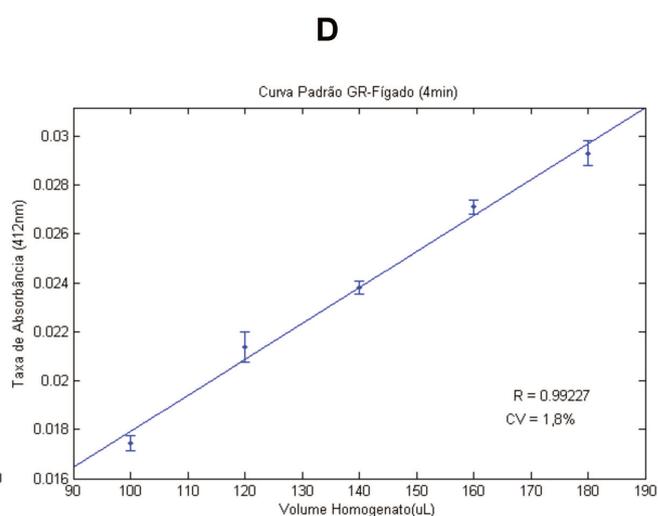
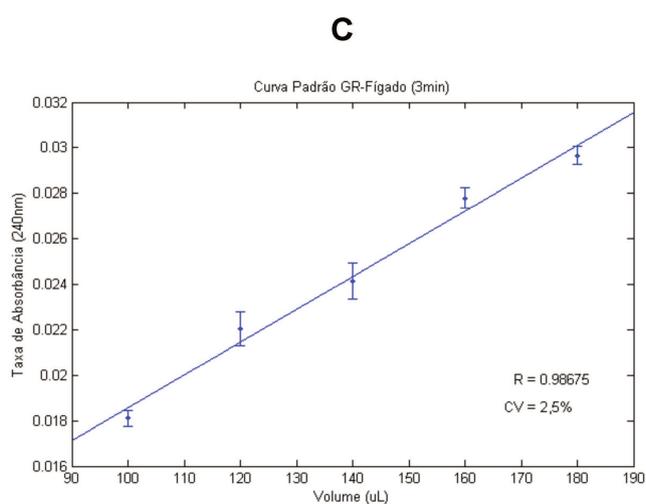
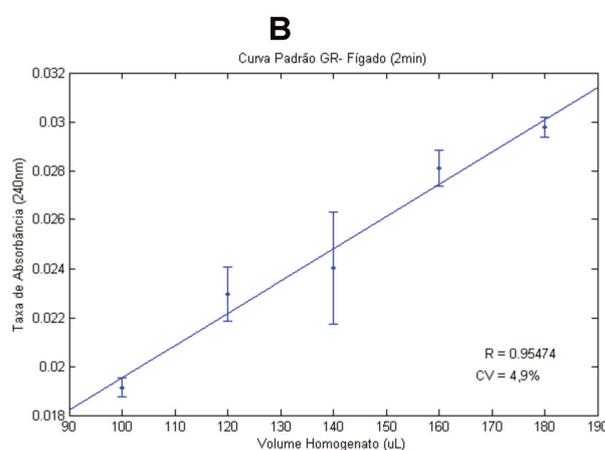
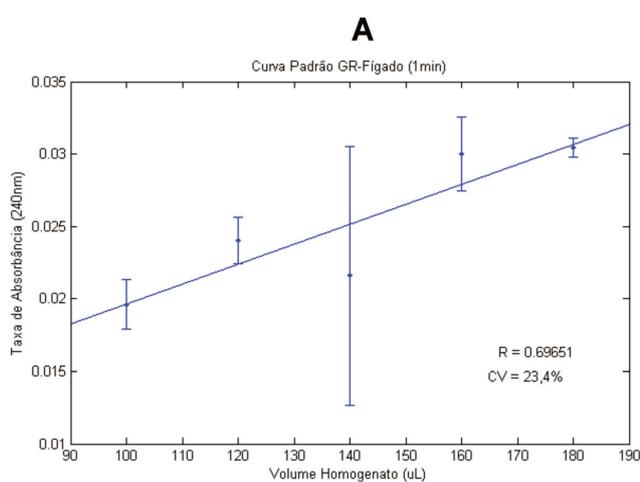


Figura 2: Curva-padrão com diferentes volumes e tempos de reação da enzima catalase: 30 (A),60(B),90(C) e 120(D)seg. e 50,70,90,110,130 e 150 μL de homogenato.

Escolhemos a condição experimental com o volume de 110 μL de amostra e um tempo de leitura de 90 segundos, pois apresentaram melhor linearidade ($R:0,994$) e menor variabilidade ($CV:3,5\%$) dos pontos obtidos.

A.III. Glutationa Redutase.

Para a enzima Glutationa Redutase contruimos várias curvas com os volumes de variando de 100, 120, 140, 160 e 180 μL e com os tempos de reações de 60(A),120(B),180(C),240(D) e 300(E) segundos. Os resultados estão apresentados abaixo:



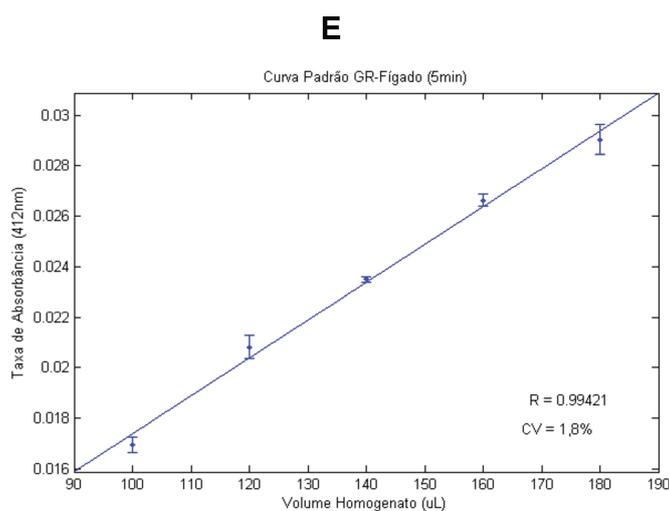


Figura 3: Curvas com diferentes tempos de leitura: 60(A),120(B),180(C),240(D) e 300(E)segundos e volumes de homogenato 100,120,140,160 e 180µL.

Observa-se que a maior correlação, seguida na menor variabilidade dos dados foi encontrada na curva de 240 segundos. E o volume de homogenato escolhido foi o com 140 µL.

A.IV. Superóxido Dismutase

A Figura abaixo apresenta a curva padrão da enzima SOD no tecido hepático.

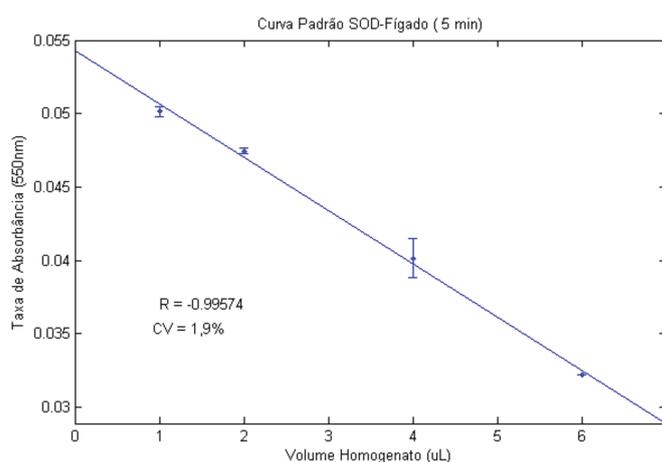


Figura 4: Curva com diferentes volumes 1,2,4 e 6 µL de homogenato e taxa de absorbância da do NBT-diformazan

O tempo de leitura escolhido para a enzima SOD foi o de 5 minutos com volume de 6µl. A curva padrão realizada com a SOD isolada para determinar a atividade está apresentada abaixo.

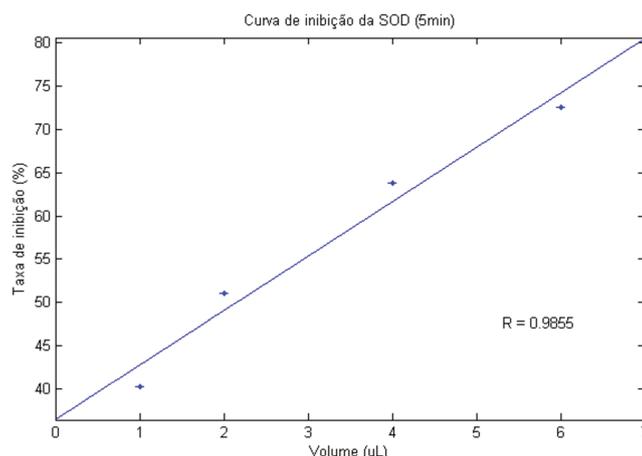


Figura 5: Curva de inibição da SOD em diferentes volumes: 1,2,4 e 6 µL.

A.V. Cálculo da atividade enzimática.

Uma vez que a faixa linear e os menores volumes foram encontrados foi realizado o cálculo da atividade enzimática segundo a Lei de Beer e os valores expressos em U/g segundo a equação abaixo.

$$\text{Equação: } \frac{\text{Taxa (abs/min)} * V_c \text{ (mL)} * V_H \text{ (mL)}}{\epsilon \text{ (mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) * \text{caminho óptico (cm)} * V_A \text{ (mL)} * M \text{ (g)}}$$

onde, a taxa representa o valor de absorvância; V_c o volume da cubeta ; V_H o volume total do homogenato preparado. E o coeficiente de extinção molar, para o H_2O_2 equivale a $0,04 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e para o TNB $13,6 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; V_A é o volume de amostra padronizado no ensaio; M é a massa de tecido utilizada no preparo do homogenato

ANEXO III

PARECER DO COMITE DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS CEUA/UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar e fígado de ratos Wistar**", protocolo nº **2626-1(A)**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo / Juliana Pascuotte Candido**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 18 de dezembro de 2015.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

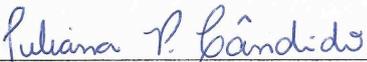
Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO IV

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Efeitos da suplementação de óleo de arroz no comportamento alimentar e fígado de ratos Wistar**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de dezembro, 2015

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Juliana Pascuotte Cândido**
RG n.º 35.057.798-5

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Denise Vaz de Macedo**
RG n.º 9.126.972