UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

IMPACTO DOS ÓLEOS DE DUAS VARIAÇÕES DE PALMA (E. *guineensis* E HÍBRIDA) E AZEITE DE OLIVA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS

RAFAEL CARVALHO SALES

RIO DE JANEIRO 2021



Universidade Federal do Rio de Janeiro

IMPACTO DOS ÓLEOS DE DUAS VARIAÇÕES DE PALMA (E. *guineensis* E HÍBRIDA) E AZEITE DE OLIVA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS

Rafael Carvalho Sales

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **mestre em Nutrição Humana**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Tavares do Carmo Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Coelho de Velasco

RIO DE JANEIRO JANEIRO DE 2021

IMPACTO DOS ÓLEOS DE DUAS VARIAÇÕES DE PALMA (E. guineensis E HÍBRIDA) E AZEITE DE OLIVA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS

Rafael Carvalho Sales

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE **MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA**

Examinada por:

Prof^a. Dr^a. Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha, D.Sc. Examinadora Titular - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane, D.Sc. Examinador Titular- Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Eliane Fialho de Oliveira, D.Sc. Examinadora Suplente - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Daniela de Barros Mucci, D.Sc. Examinadora Suplente - Universidade Federal do Rio de Janeiro

> Prof^a. Dr^a. Wilza Arantes Ferreira Peres, D.Sc. Revisora - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Tavares do Carmo, D.Sc. (Orientadora e Presidente) Universidade Federal do Rio de Janeiro

> Prof^a. Dr^a. Patricia Coelho de Velasco, D.Sc. (Coorientadora) Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL JANEIRO DE 2021

DEDICATÓRIA

Como disse o dr. Carlos Chagas Filho, "na universidade se ensina porque se pesquisa", e considerando ainda que toda a prática clínica do profissional nutricionista deve ser baseada em evidências, dedico este trabalho aos meus alunos de graduação e pós-graduação e aos pacientes que vivem com doenças hepáticas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às professoras e aos técnicos do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Esta foi minha casa por muitos anos, e nunca me senti tão acolhido antes, inclusive nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigado a todos por todo o carinho, a gentileza e o cuidado que sempre tiveram comigo.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos disponibilizada e aos órgãos de fomento FAPERJ e CNPq pelo financiamento desta pesquisa. Obrigado também à equipe do Laboratório de Bioquímica Nutricional da UFRJ pelos anos de parceria. Um agradecimento especial à Karla Dias, farmacêutica, com quem dividi não só o trabalho, como também conversas e amizade.

Obrigado à profa. dra. Wilza Peres e à profa. dra. Tatiana de Paula, duas das profissionais que mais admiro e com quem tive o prazer de trabalhar de perto. Obrigado pela oportunidade no Ambulatório de Hepatologia do HUCFF/UFRJ, pelos ensinamentos, pela amizade e pela consideração. Ter atravessado a jornada de vocês mudou para sempre o rumo da minha carreira e a minha forma de ser nutricionista!

Agradeço às minhas orientadoras, profa. dra. Patrícia Coelho de Velasco e profa. dra. Maria das Graças Tavares do Carmo. Duas pessoas que me acolheram e me deram oportunidade quando eu era apenas um graduando. Obrigado por terem investido em mim, por terem me ajudado a superar tantas dificuldades e por todo apoio e confiança que sempre tiveram em mim! Carregarei com orgulho, por toda minha carreira, o nome de vocês como minhas orientadoras.

Obrigado ao Guilherme Pessoa, por todo o apoio e companhia, e por ter tornado esse sonho viável. Jamais esquecerei o que fez por mim. Você acreditou em mim mais do que eu mesmo, e isso foi fundamental. Obrigado mesmo!

Agradeço à Juliana Bomtempo, minha irmã, minha melhor amiga, minha confidente, uma das minhas maiores apoiadoras. Obrigado por ser minha fortaleza e minha âncora. Como diz nossa música: *"you make me live, whenever this world is cruel to me, I got you to help me forgive*".

Obrigado, Renan Schadt, pelo companheirismo, pelas palavras, pelo ombro, e por tudo. Uma longa jornada até aqui, que valeu muito a pena. Essa jornada foi menos difícil por sua ajuda, e por isso (e tanto mais) eu sou muito grato a você, Nan! "*Cause when I start to crumble, you know how to keep me smiling*".

Agradeço aos meus irmãos Leonardo, Matheus e Mikael, pelo apoio sempre. E agradeço, acima de tudo, à minha mãe, Gilda Helena, por ser a peça fundamental por trás da minha trajetória. Sem você eu nunca teria conseguido. Obrigado por tudo!

"Diga-lhes que esta vida não cessou de me maravilhar."

(Ludwig Wittgenstein)

Resumo da dissertação apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **mestre em Nutrição Humana.**

IMPACTO DOS ÓLEOS DE DUAS VARIAÇÕES DE PALMA (E. *guineensis* E HÍBRIDA) E AZEITE DE OLIVA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS

Rafael Carvalho Sales

Janeiro – 2021

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Tavares do Carmo Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Coelho de Velasco

RESUMO

Doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é altamente prevalente no mundo. Sua forma mais grave se manifesta como Esteatohepatite não-alcoólica (EHNA). Dentre os fatores de risco para desenvolvimento de DHGNA está o consumo excessivo de lipídios. Considerando que o óleo de palma africana (OPA) é o mais consumido no planeta, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do consumo de dietas hiperlipídicas contendo OPA (GPA), óleo de palma híbrida (GPH) ou azeite de oliva (GAO) no tecido hepático. Camundongos C57BI/6J machos foram alimentados com dietas hiperlipídicas (41% de gorduras) contendo OPA, OPH ou AO por 8 semanas e comparados ao grupo controle (GC), que consumiu ração isoenergética. Adiposidade foi mensurada por tomografia computadorizada. Massa corporal, do tecido adiposo e do fígado, assim como a concentração de gordura hepática (Bligh-Dyer), perfil lipídico, glicemia e enzimas hepáticas foram avaliados. Histologia hepática (Hematoxilina-Eosina) e transcriptômica (baseado em microarray) foram realizadas. Teste ANOVA com Newman-Keuls foi utilizado. Massa corporal estava aumentada em GPA (p<0.001) e adiposidade em GAO (GCvs.GAO p≤0.01, GPAvs.GAO p≤0.05, GPHvs.GAO p≤0.05). Todas as rações hiperlipídicas causaram alterações no perfil lipídico e na glicemia, especialmente GPH em VLDL, triglicerídeos e fosfatase alcalina (p≤0.001). GPH promoveu a maior concentração de gordura hepática (42,76±1,58), seguido de GPA (33,94±1.13). GAO demonstrou teor de gordura hepática comparável a GC (16,46±0,34 e 14,71±0,70, respectivamente). GPA e GPH induziram balonamento de hepatócitos. Alterações transcricionais em GAO estavam relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e de ácidos graxos, enquanto de GPA envolveram homeostase de cálcio iônico e GPH localização de proteínas. GPA e GPH promoveram EHNA em camundongos via alterações de transcrição em hepatócitos. Estes resultados preocupam, visto que esses óleos estão amplamente presentes em alimentos industrializados.

IMPACTO DOS ÓLEOS DE DUAS VARIAÇÕES DE PALMA (E. *guineensis* E HÍBRIDA) E AZEITE DE OLIVA NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS

Rafael Carvalho Sales January – 2021

Advisor: Prof. Dr. Maria das Graças Tavares do Carmo Co-advisor: Prof. Dr. Patrícia Coelho de Velasco

ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is high prevalent worldwide. The most severe form is Nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Among risk factors for the development of NAFLD is excessive lipid intake. Since Palm (P) oil is the most consumed oil in the world, we aimed to investigate the effects of high-fat diets made with P oil, Hybrid Palm (HP) oil or Olive (O) oil in liver. 24 male mice (C57Bl/6J) were fed high-fat diet (41% fat) containing P, HP or O oils for 8 weeks and compared to a Control (C) group, fed chow diet. Adiposity was measured with computed tomography. Body, adipose tissue and liver weights, as well as liver fat (Bligh-Dyer), blood lipid profile, glucose and liver enzymes were measured. Liver histology (Hematoxylin-Eosin) and transcriptome (microarraybased) were performed. ANOVA test with Newman-Keuls were used. Body weight was increased in P group (p<0.001) and body fat in O group (Cvs.O p≤0.01, Pvs.O p≤0.05, HPvs.O p≤0.05). All high-fat diets disturbed blood lipid profile and glucose, with marked effects of HP on VLDL, triglycerides and alkaline phosphatase (p≤0.001). HP had the highest liver fat (42.76±1.58), followed by P (33.94±1.13). O had fat amount comparable to C (16.46±0.34, 14.71± 0.70, respectively). P and HP oils induced hepatocyte ballooning. Transcriptome alterations of O group were related to amino acid metabolism and FA metabolism, P group to calcium ion homeostasis and HP oil to protein localization. Both P and HP oils induced NASH in mice via disturbed hepatocyte transcription. This raises concern about the content of these oils in several industrialized foods.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS LIPÍDIOS	3
2.1.1	Estrutura dos lipídios	3
2.1.2	Função dos lipídios	4
2.2	LIPÍDIOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	7
2.2.1	Classificação NOVA dos alimentos	7
2.2.2	Gordura vegetal parcialmente hidrogenada	8
2.2.3	Gordura interesterificada	9
2.2.4	Óleo de palma africana	11
2.2.5	Óleo de palma híbrida	12
2.2.6	Azeite de oliva	13
2.3	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA	14
2.3.1	Definição, etiologia e epidemiologia	14
2.3.2	Fisiopatologia e diagnóstico	15
2.3.3	Modelos experimentais de DHGNA	19
2.3.4	Lipídios e DHGNA	22
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	Objetivo geral	26
4.2	Objetivos específicos	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	Animais e dietas experimentais	27
5.2	Desenho experimental	28
5.3	Avaliação da massa corporal e do consumo dietético	29
5.4	Adiposidade e volumetria hepática	29
5.5	Coleta de sangue e de tecidos	29
5.6	Avaliação laboratorial do plasma	30
5.7	Histologia do tecido hepático	30
5.8	Concentração de gordura no fígado	30
5.9	Transcriptômica	31
5.10	Análise estatística	31
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	REFERÊNCIAS	52

ANEXOS	60
Anexo A – Aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA/UFRJ	61
Anexo B – Artigo publicado na revista International Journal of Molecular	63
Sciences	

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Representação esquemática das classes de lipídios relevantes para a	
	fisiologia humana	
Tabela 1	Aspectos nutricionais envolvidos na patogênese da DHGNA	16
Tabela 2	Modelos animais de indução de Doença hepática gordurosa não-alcoólica	19
Tabela 3	Conteúdo energético total e distribuição percentual de macronutrientes das	29
	rações GPA, GPH e GAO	
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos das rações GPA, GPH e GAO	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AASLD American Association for the Study of Liver Diseases
- AG Ácidos graxos
- AGS Ácidos graxos saturados
- AGMI Ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI Ácidos graxos poli-insaturados
- AGT Ácidos graxos trans
- AKT Protein kinase B / Proteína quinase B
- ALT Alanina aminotransferase
- AO Azeite de oliva
- AST Aspartato aminotransferase
- ATP Adenosina trifosfato
- AUP Alimentos ultraprocessados
- CoQ10 Coenzima Q10 / Ubiquinona
- COX Ciclo-oxigenase
- COX-2 Ciclo-oxigenase 2
- CT Colesterol total
- CYP Citocromo P450
- DCNT Doenças crônicas não-transmissíveis
- DCV Doenças cardiovasculares
- DHGNA Doença hepática gordurosa não-alcoólica
- Dkk-1 Proteína dickkopf 1
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- EASL European Association for the Study of the Liver
- EHNA Esteatohepatite não-alcoólica
- EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ERO Espécies reativas de oxigênio
- FA Fosfatase alcalina
- FADH₂ Flavina-adenina dinucleotídeo
- GAO Grupo Azeite de Oliva
- GC Grupo Controle
- GI Gordura interesterificada
- GGT Gama-glutamil transpeptidase
- GLUT5 Glucose transporter 5
- GPA Grupo Palma Africana
- GPH Grupo Palma Híbrida

- GVPH Gordura vegetal parcialmente hidrogenada
- HDL Lipoproteína de alta densidade
- HNF-4α Fator nuclear hepático 4α
- HNF-4y Fator nuclear hepático 4y
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IL Interleucina
- JNK Quinases c-Jun N-terminal
- Kcal Quilocalorias
- LDL Lipoproteína de baixa densidade
- LOX Lipoxigenase
- LXR Liver X receptor / Receptor X hepático
- mRNA Ácidos ribonucleicos mensageiros
- mTOR Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
- MyD88 Myeloid differentiation factor 88
- NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NAS Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score
- NF-KB Fator nuclear Kappa B
- Nfr-2 Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
- OPA Óleo de palma africana
- OPH Óleo de palma híbrida
- ORAC Capacidade de absorbância dos radicais oxigenados
- PERK Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
- PI3K Fosfatidilinositol 3-quinase
- PI(4,5)P₂ Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
- PIP₃-Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
- PLA₂ Fosfolipase A₂
- $PPAR\alpha$ Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α
- PPAR β Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma β
- PPARy1 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma y1
- PPARy2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma y2
- RXR Receptor do retinoide X
- SNP Polimorfismo de nucleotídeo único
- SREBP-1c Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1-c
- TAG Triacilglicerois
- TC Tomografia computadorizada
- TEAC Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox

- TLR4 Receptores do tipo Toll 4
- TNF Fator de necrose tumoral
- UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro
- USDA United States Department of Agriculture
- USG Ultrassonografia
- VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares não só da população brasileira, como também a nível global, seguem atualmente padrão baseado em alimentos ultraprocessados (AUP) (MONTEIRO et al., 2013), contrariando o recomendado, por exemplo, pelo Guia Alimentar Para a População Brasileira, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014). Há preocupação com a excessiva ingestão desse tipo de alimento, pois as evidências vêm apontando associação entre consumo de AUP e excesso de peso, risco de doenças cardiovasculares (DCV) e elevada mortalidade (MENDONÇA et al., 2016; SROUR et al., 2019; SCHNABEL et al., 2019).

Dentre os ingredientes utilizados na formulação dos AUP estão as gorduras. As gorduras utilizadas na indústria de alimentos contribuem para atingir as características sensoriais almejadas no produto final, como textura, odor, sabor e palatabilidade (NESTEL; NOAKES; CLIFTON, 1996). O padrão dietético ocidental (abundante em AUP) é rico em ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos *trans* (AGT) produzidos industrialmente (derivados da hidrogenação de alguns óleos vegetais) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ômega-6, enquanto carece de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e AGPI ômega-3 (GAINO et al., 2012).

Após o estabelecimento da relação entre consumo de AGT e ocorrência de efeitos deletérios à saúde humana, houve demanda global por exclusão de óleos e gorduras fontes desse tipo de ácido graxo (AG) na formulação de AUP (MICHA; MOZAFFARIAN, 2008). Com isso, a indústria de alimentos tem empregado duas alternativas: utilização de gordura interesterificada (GI) – na qual os ácidos graxos são realocados nas posições *sn* da molécula de triacilglicerol (TAG) de algum óleo vegetal, conferindo as características desejadas – ou utilização de óleo de palma africana (OPA) (HAYES; PRONCZUK, 2010).

O óleo obtido a partir da palma africana, conhecido popularmente no Brasil como azeite de dendê, é um óleo avermelhado obtido a partir do mesocarpo dos frutos da palma (*Elaeis guineensis*). Trata-se de um óleo vegetal que, à exceção dos demais, é semissólido em temperatura ambiente e apresenta elevada concentração de AGS. Além de conferir as características sensoriais desejadas aos AUP, não possui AGT e assim permite a inserção da expressão "zero *trans*" nas embalagens dos alimentos, agregando valor ao preço final do produto. Ainda, o OPA é de fácil cultivo e altamente rentável, o que lhe confere o posto de óleo vegetal mais cultivado e comercializado no planeta. Sendo assim, grande parte dos AUP da atualidade possuem OPA em sua composição (MBA; DUMONT; NGADI, 2015).

1

A palma africana, no entanto, pode sofrer de uma doença chamada amarelecimento fatal, que causa danos irreversíveis, perda da planta e prejuízo na safra. Por conta disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) hibridizou duas variações de palma (*Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*) e produziu a palma híbrida, uma planta com resistência a essa doença e cujo óleo possui as mesmas características sensoriais do OPA, todavia apresentando menor teor de AGS e maior teor de AGMI (principalmente ácido oleico, C18:1), mostrando-se como seu potencial substituto, considerando os aspectos nutricionais e agrícolas (EMBRAPA, 2010).

Apesar de promissor, os efeitos biológicos do óleo de palma híbrida (OPH) ainda são dúbios. Dois ensaios clínicos randomizados mostraram que a suplementação com OPH promoveu as mesmas alterações benéficas no perfil lipídico e na capacidade antioxidante plasmática de indivíduos adultos que a suplementação com azeite de oliva (AO), o que levou o OPH a receber a alcunha de "equivalente tropical do azeite de oliva" por parte desses pesquisadores (LUCCI et al., 2016; OJEDA et al., 2017). Um modelo experimental em primatas, no entanto, revelou resultados prejudiciais após o consumo desse óleo. Dentro de um contexto de dieta hiperlipídica (mimetizando a dieta ocidental), comparando-se OPA e OPH, ambos geraram acúmulo hepático de gordura e disfunções metabólicas no fígado, com efeito mais pronunciado após o consumo de OPH (SPREAFICO et al., 2018). Essas alterações são características de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA).

Essa doença hepática é crônica, progressiva e pode levar ao óbito. Com prevalência estimada em 30% na população mundial, é a principal enfermidade que afeta o fígado na atualidade (CHALASANI et al., 2018). Os dados disponíveis em modelos experimentais e em culturas de células apontam que o excesso de AGS, em especial de ácido palmítico, é gatilho para o desenvolvimento e a progressão da DHGNA. Estes ácidos graxos podem ser lipotóxicos nos hepatócitos, geram disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, estresse oxidativo e ativação de caspases e levam à apoptose celular (LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013). As sociedades americana e europeia de Hepatologia mencionam os AGS como possíveis promotores da DHGNA, contudo não especificam quais fontes dietéticas desses AG possuem esse efeito (EASL; EASD; EASO, 2016; CHALASANI et al., 2018).

Considerando que o alto consumo mundial de AUP, que os AUP atualmente apresentam OPA e OPH em sua composição e a crescente prevalência de DHGNA na população mundial, existe substancial lacuna no conhecimento acerca da relação entre OPA, OPH e DHGNA. Nesse sentido, esse trabalho objetiva investigar o efeito do consumo de dietas hiperlipídicas contendo OPA, OPH ou AO sobre o tecido hepático em modelo experimental com camundongos.

2. REVISÃO DA LITERATURA 2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DOS LIPÍDIOS

2.1.1 Estrutura dos lipídios

"Lipídio" é o termo outorgado a uma classe de moléculas cuja semelhança se dá em função de serem insolúveis em água e por poderem ser extraídas de suas matrizes a partir de solventes não-polares, tais como hexano e clorofórmio (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; FUCHS et al., 2011). Essas características de solubilidade se devem à estrutura química dos lipídios e dos solventes não-polares, com baixa ação como formadores de ligações de hidrogênio, baixa eletronegatividade, baixo momento dipolar e baixa permissividade relativa (REICHARDT; WELTON, 2011).

Dentre os lipídios existentes, alguns se destacam quanto à sua relevância na fisiologia humana. Pode-se classificar esses composts em duas classes: os isoprenoides e os derivados de AG. Os isoprenoides são moléculas provenientes da via do mevalonato, compreendendo colesterol e seus ésteres, hormônios esteroides tais como a testosterona e o estradiol, além das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. Já os derivados de AG, como a nomenclatura sugere, são moléculas cuja origem remonta a algum AG específico. As subclasses são os AG livres; os AG oxigenados, como prostaglandinas e leucotrienos; as amidas de AG, como os glicerolipídios e os esfingolipídios; e os ésteres de AG, como os monoacilglicerois, diacilglicerois e TAG (PERINI et al., 2010; FUCHS et al., 2011) (figura 1).



Figura 1. Representação esquemática das classes de lipídios relevantes para a fisiologia humana. Adaptado de Fuchs et al. (2011).

Os triacilglicerois são gorduras neutras formadas a partir da conjugação de três moléculas de AG junto a uma de glicerol, e são as estruturas lipídicas de maior presença na fisiologia humana. Segundo a definição clássica adotada pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* e pela *International Union of Pure and Applied Chemistry*, AG são ácidos carboxílicos alifáticos que, quando ligados ao poliol glicerol, formam acilglicerois. O glicerol é um álcool com grupamentos hidroxila, enquanto os AG possuem grupamento carboxila. Esses grupamentos podem sofrer reação e formar uma ligação éster. Considerando que o glicerol possui três hidroxilas em sua estrutura química, ele apresenta, então, capacidade de formar éster com três AG, o que caracteriza um TAG (IUPAC-IUB, 1977).

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com uma série de parâmetros, incluindo o tamanho da cadeia carboxílica, a presença ou ausência de insaturações e, caso haja, sua quantidade, tipo (cis ou trans) e localização. Quanto ao tamanho, podem possuir entre quatro e trinta e seis carbonos em sua cadeia, sendo classificados em AG de cadeia curta, quando possuem entre três e sete carbonos, AG de cadeia média, quando possuem entre oito e treze carbonos e AG de cadeia longa, quando possuem mais do que catorze carbonos. Estes compostos podem possuir ligações simples entre todos os carbonos, sendo chamados de AGS, ou possuir duplas ligações (insaturações). Caso o AG possua apenas uma única instauração é chamado de AGMI, e caso possua duas ou mais duplas ligações é chamado de AGPI. É importante destacar que não ocorrem duplas ligações ininterruptas - as insaturações dos AGPI são separadas por grupamentos metileno. Essas duplas ligações nos AGMI e nos AGPI podem ainda ser por ligação cis ou trans, a depender da conformação estereoisomérica. Por fim, a localização dessas ligações químicas é classificada utilizando o grafema grego ω (ômega) ou "n", denotando a localização da primeira contada a partir do grupamento metil terminal (RATNAYAKE; GALLI, 2009; TVRZICKA et al., 2011).

A função e o metabolismo dos TAG são diretamente relacionados ao tipo de AG presente na molécula, conforme as classificações acima mencionadas.

2.1.2 Função dos lipídios

Tradicionalmente os lipídios são associados à função de reserva energética, dada sua capacidade de serem metabolizados e oxidados. No organismo humano, os TAG são depositados no tecido adiposo e disponibilizados aos demais tecidos na forma de AG livres quando há demanda energética. Função semelhante é exercida pelos TAG nas plantas. Sabe-se, no entanto, que os lipídios exercem outras funções biológicas diversas, tais como componentes estruturais da membrana plasmática das células, sinalizações intra e intercelular, transporte de elétrons entre os complexos de membrana mitocondriais e modulação da expressão gênica (NASCIMENTO; RIBEIRO; OYAMA, 2009; BOLSONI-LOPES; ALONSO-VALE, 2015).

Todas as células humanas são revestidas por uma bicamada fosfolipídica, que formam a membrana plasmática. A principal função dessa membrana é servir de contenção para as organelas e moléculas, a fim de não haver seu extravasamento para o meio extracelular. Essa bicamada é formada essencialmente por fosfolipídios anfipáticos, que contêm um grupamento fosfato hidrofílico localizado nas extremidades em contato com o meio extracelular e com o citoplasma da célula, enquanto dois AG conjugados a cada um desses grupamentos fosfato se organizam de forma a interagirem com os AG dos fosfolipídios da outra porção da bicamada. Essa dinâmica se dá pela característica dos AG de serem hidrofóbicos. Sendo assim, forma-se uma membrana dupla (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004).

O tipo de AG incorporado na membrana plasmática das células guarda relação proporcional direta com a composição lipídica da alimentação habitual do indivíduo. Sabe-se, por exemplo, que uma alimentação rica em AGS fornece ao organismo esse tipo de AG para a incorporação nas membranas fosfolipídicas. O mesmo acontece caso haja oferta aumentada de AGMI e/ou AGPI. O impacto fisiológico dessas alterações se dá essencialmente pela fluidez da membrana. As moléculas de AGS são carboxílicas e lineares, permitindo interações de van der Waals entre elas. Essas interações estabelecem um agrupamento compacto, sem fluidez. Quando ocorre insaturação, entretanto, há deslocamento espacial dessa cadeia molecular em virtude dessa ligação cis, causando uma curvatura. Isso faz com que os AG não consigam se compactar, o que confere à membrana plasmática maior fluidez. Dessa forma, uma alimentação rica em AGMI e AGPI gera células com membranas menos rígidas (NELSON; COX, 2002). Sunshine e Iruela-Arispe (2017) apontam que membranas rígidas - ou seja, com elevada concentração de AGS - representam menor ativação de receptores de membrana, tais como os receptores acoplados à proteína G, o que impacta as funções fisiológicas diretamente.

Outra função exercida pelos lipídios é a sinalização celular. Uma das etapas mais importantes de sinalização intracelular mediada pelos lipídios se dá via Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂). Em estudo de revisão, Nielson e Rutter (2018) apontam que PI(4,5)P₂ pode ser fosforilado pela Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), gerando Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). Este composto, por sua vez, recruta a proteína quinase B (AKT), que ativa vias necessárias para o crescimento e o ciclo celular, tais como a Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Essa via é conhecida como

PI3K/AKT/mTOR. Quanto à sinalização intercelular, os lipídios estão envolvidos em uma série de mecanismos. Um dos papeis de mais destaque é na modulação na resposta inflamatória. Mediadores lipídicos conhecidos como prostaglandinas e leucotrienos são derivados de AGPI, esterificados a fosfatos na membrana plasmática, com participação da enzima Fosfolipase A₂ (PLA₂). Esta enzima cliva a ligação entre o AGPI e o fosfato, gerando o AGPI que será metabolizado em prostaglandinas e leucotrienos via Ciclo-oxigenase (COX), Lipoxigenase (LOX) ou algumas enzimas da família Citocromo P450 (CYP) (NORRIS et al., 2014; DENNIS; NORRIS, 2015).

Os lipídios participam diretamente do transporte de elétrons nos complexos de membrana mitocondrial. A partir de vias metabólicas de oxirredução, moléculas reduzidas tais como a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e a Flavina-adenina Dinucleotídeo (FADH₂) chegam à membrana mitocondrial. O NADH doa elétrons para o Complexo I, enquanto o FADH₂ doa seus elétrons para o Complexo II. Ambos os complexos necessitam transportar esses elétrons para o Complexo III para que eles sigam a via, gerando o gradiente de elétrons necessário para a síntese de Adenosina Trifosfato (ATP). Esse transporte entre os Complexos I e II para o Complexo III ocorre via um mediador chamado Ubiquinona, também conhecido como Coenzima Q10 (CoQ10). A CoQ10 é uma molécula com uma quinona conjugada a uma cadeia lipídica poli-isoprenoide. Ela é sintetizada pela mesma via do colesterol – via do mevalonato (WANG; HEKIMI, 2016; STEFELY; PAGLIARINI, 2017).

Ainda, sabe-se que os AG possuem a capacidade de modular a expressão gênica das células, principalmente os AGPI da série n-3. Já foram identificados diversos receptores – principalmente no tecido hepático – aos quais esses AG se ligam e modulam a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a transcrição de genes, dentre eles: Proteína de Ligação a Elemento Regulador de Esterol 1-c (SREBP-1c), Fator Nuclear Hepático 4 α e Fator Nuclear Hepático 4 γ (HNF-4 α e HNF-4 γ , respectivamente), Receptor de Retinoide X (RXR), Receptor X Hepático (LXR), e especialmente os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma α , β , γ 1 e γ 2 (PPAR α , PPAR β , PPAR γ 1 e PPAR γ 2, respectivamente) (JUMP et al., 2005). A ativação do PPAR α , por exemplo, está envolvida na transcrição gênica de enzimas de betaoxidação de AG e nas adaptações metabólicas necessárias à cetogênese (NAKAMURA; YUDELL; LOOR, 2014).

2.2 LIPÍDIOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

2.2.1 Classificação NOVA dos alimentos

Para compreender a utilização dos lipídios na indústria de alimentos, é preciso primeiramente conceituar a classificação NOVA dos alimentos, desenvolvida em 2009 (MONTEIRO, 2009) e adotada pelo Guia Alimentar para a População Brasileira de 2014, publicado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2014). Segundo o Guia Alimentar, os alimentos podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com o grau de processamento que sofreram, conforme descrição a seguir:

- Alimentos in natura e minimamente processados:

"Alimentos *in natura* são obtidos diretamente de plantas ou de animais e não sofrem qualquer alteração após deixar a natureza. Alimentos minimamente processados correspondem a alimentos *in natura* que foram submetidos a processos de limpeza, remoção de partes não comestíveis ou indesejáveis, fracionamento, moagem, secagem, fermentação, pasteurização, refrigeração, congelamento e processos similares que não envolvam agregação de sal, açúcar, óleos, gorduras ou outras substâncias ao alimento original". (BRASIL, 2014, p. 29).

- Ingredientes culinários:

"São produtos extraídos de alimentos in natura ou da natureza por processos como prensagem, moagem, trituração, pulverização e refino. São usados nas cozinhas das casas e em refeitórios e restaurantes para temperar e cozinhar alimentos e para criar preparações culinárias variadas e saborosas, incluindo caldos e sopas, saladas, tortas, pães, bolos, doces e conservas". (BRASIL, 2014, p. 34).

- Alimentos processados:

"Alimentos processados são fabricados pela indústria com a adição de sal ou açúcar ou outra substância de uso culinário a alimentos in natura para torna-los duráveis e mais agradáveis ao paladar. São produtos derivados diretamente de alimentos e são reconhecidos como versões dos alimentos originais. São usualmente consumidos como parte ou acompanhamento de preparações culinárias feitas com base em alimentos minimamente processados". (BRASIL, 2014, p. 38). - Alimentos ultraprocessados (AUP):

"Alimentos ultraprocessados são formulações industriais feitas inteiramente ou majoritariamente de substâncias extraídas de alimentos (óleos, gorduras, açúcar, amido, proteínas), derivadas de constituintes de alimentos (gorduras hidrogenadas, amido modificado) ou sintetizadas em laboratório com base em matérias orgânicas como petróleo e carvão (corantes, aromatizantes, realçadores de sabor e vários tipos de aditivos usados para dotar os produtos de propriedades sensoriais atraentes). Técnicas de manufatura incluem extrusão, moldagem, e pré-processamento por fritura ou cozimento". (BRASIL, 2014, p. 41).

Os lipídios estão presentes na alimentação humana nas quatro classes de alimentos propostas pela NOVA. Cabe, entretanto, dar destaque aos lipídios na indústria de alimentos, utilizados na confecção de AUP. Nesse tipo de alimento os lipídios possuem a função de conferir as características sensoriais almejadas no produto final, como textura, odor, sabor e palatabilidade. Para atingir tais especificações, os óleos e gorduras utilizados devem, preferencialmente, possuir aspecto semi-sólido em temperatura ambiente e ser inodoros e sem sabor (NESTEL; NOAKES; CLIFTON, 1996). Para tanto, a indústria de alimentos adotou diferentes fontes lipídicas ao longo dos anos, como a gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH), a gordura interesterificada (GI), o OPA e o OPH.

2.2.2 Gordura vegetal parcialmente hidrogenada

Em busca de uma gordura que, além das características sensoriais desejadas para os AUP mencionadas anteriormente, tivesse plasticidade e estabilidade oxidativa em temperatura ambiente, desenvolveu-se no ano de 1897 a tecnologia da hidrogenação de óleos vegetais – apesar de ter sido efetivamente patenteada e utilizada na indústria de alimentos somente a partir de 1939 (KADHUM; SHAMMA, 2017). Essa técnica consiste em promover reação entre o gás hidrogênio e um óleo vegetal insaturado, podendo ocorrer tanto com AGMI quanto com AGPI. Há hidrogenação das ligações duplas do AG, saturando-as. Esse processo ocorre em um reator de hidrogenação, com controle de temperatura, pressão e velocidade de agitação, além da presença de um catalisador adequado (TONETTO et al., 2009).

Ao passo que a hidrogenação parcial causa saturação das ligações duplas e, portanto, transforma um óleo em uma gordura semi-sólida, outros dois processos

8

químicos também ocorrem durante a reação: *trans*-isomerização de algumas ligações duplas e mudança conformacional de duplas ligações (isomerização posicional). Isso quer dizer que a GVPH final (e, portanto, os AUP) apresenta perfil de AG diferente do seu óleo vegetal de origem, agora com uma concentração considerável de AGT (BERNAS et al., 2009; BERNAS et al., 2010).

Ácidos graxos *trans* estão presentes na alimentação humana há séculos, principalmente nos laticínios. Animais ruminantes como a vaca possuem trato gastrointestinal especializado para digerir grandes quantidades de matéria vegetal, e para isso possuem o rúmen. No rúmen há microbiota diversa, capaz de auxiliar na degradação dessa matriz vegetal e sintetizar AGT, que são incorporados ao leite e seus derivados. Nos laticínios, no entanto, os AGT estão em baixa concentração (até 8% nos produtos lácteos *versus* até 50% na GVPH) e são diferentes dos presentes na GVPH: enquanto nos laticínios há maior quantidade de ácido vaccênico (C18:1 *trans*-11), na GVPH lidera o ácido elaídico (C18:1 *trans*-9) (KUHNT; DEGEN; JAHREIS, 2016). Apesar da semelhança química, esses dois AG possuem efeitos metabólicos diferentes.

Em ensaios em animais e *in vitro*, os AGT oriundos da gordura de ruminantes demostraram propriedades antiaterogênicas e anticarcinogênicas e supressão de resposta inflamatória pela diminuição da secreção de Interleucina 2 e de Fator de Necrose Tumoral (TNF). Por outro lado, os AGT provenientes dos AUP e da GVPH demonstraram efeitos deletérios sobre a saúde humana. Investigações epidemiológicas, experimentais e clínicas apontam que os AGT da GVPH possuem relação direta com o desenvolvimento de DCV, principalmente dislipidemia e aterosclerose (KUHNT; DEGEN; JAHREIS, 2016).

Considerando os efeitos negativos desses AGT observados a partir da década de 1990, mudanças nas políticas públicas foram introduzidas em vários países visando cessar o uso de GVPH na indústria de alimentos, inclusive no Brasil (DIAS et al., 2018), resultando na exigência de substituição da GVPH nos AUP (MICHA; MOZZAFFARIAN, 2008). A Organização Mundial da Saúde, inclusive, criou a iniciativa REPLACE, por meio da qual fornece diretrizes e orientações para a eliminação mundial dos AGT, produzidos industrialmente até o ano de 2023 (WHO, 2018). Devido a essa demanda global, que emergiu no final dos anos 90 e início dos anos 2000, a indústria de alimentos passou a empregar como substitutos da GVPH a GI e o OPA.

2.2.3 Gordura interesterificada

Para compreender o processo tecnológico envolvido na produção de GI, faz-se necessário conhecer a estrutura química dos TAG. Como mencionado anteriormente, o

glicerol possui três hidroxilas capazes de reagirem com as carboxilas dos AG, formando uma molécula com três AG ligados covalentemente. Essas hidroxilas que se ligam aos AG são chamadas de posições "*sn*" e, portanto, o glicerol possui três regiões *sn*. Na molécula de TAG, os AG estão nas posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3. Essas posições influenciam não só o estado físico do lipídio (podendo ser líquido, semi-sólido ou sólido), como também sua digestão. As lipases humanas são capazes de hidrolisar apenas as posições *sn*-1 e *sn*-3, liberando para absorção nos enterócitos dois AG livres e um monoacilglicerol com um AG conjugado na posição *sn*-2 (GESTEIRO; GALERA-GORDO; GONZALEZ-GROSS, 2018).

O processo de interesterificação, segundo Kadhum e Shamma (2017), consiste na troca posicional de ésteres de AG no esqueleto de glicerol, alterando a composição química do óleo e, portanto, sua estrutura física, adquirindo consistência semi-sólida ou sólida em temperatura ambiente. A interesterificação pode ser via acidólise, glicerólise ou transesterificação. São três métodos diferentes para obtenção do mesmo produto final. Essas reações podem ser resumidas como uma reação específica ou aleatória às posições *sn* do TAG, resultando em glicerol e AG livres. Adiciona-se ao meio outros AG livres de interesse (tais como o ácido palmítico C16:0, um AGS), que se ligarão nas posições *sn* vagas e, ao final, gerará a GI com a consistência desejada.

Os efeitos da GI sobre a saúde ainda são pouco explorados. Em estudos experimentais utilizando modelo de programação metabólica, a oferta de dieta normolipídica contendo GI durante a gestação e lactação de camundongos promoveu a predisposição da prole à obesidade (MAGRI et al., 2015), reduziu a ação anorexigênica central da insulina (BISPO et al., 2015), aumentou a suscetibilidade à inflamação cerebral (MISAN et al., 2015) e elevou a produção de peróxidos de hidrogênio em mitocôndrias (DE VELASCO et al., 2017). A I Diretriz sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular, publicada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em 2013, atesta que "o consumo de gordura interesterificada pode alterar lípides plasmáticos, e mais estudos são necessários para conclusões da ação dessa gordura sobre metabolismo dos humanos" (SANTOS et al., 2013, p. 23).

Apesar do uso da GI na indústria de alimentos ser vantajoso do ponto de vista da legislação (visto que é isento de AGT), sua produção envolve custos, equipamentos específicos e profissionais capacitados para a supervisão do processo. Sendo assim, o emprego de GI na produção de AUP na atualidade é limitada, observando-se maior presença nas margarinas. Para a grande maioria dos AUP opta-se pelo OPA (ORNLA-IED; SONWAI; LERTTHIRASUNTORN, 2016).

2.2.4 Óleo de palma africana

O óleo de palma africana – também conhecido popularmente no Brasil como azeite de dendê – é um óleo avermelhado obtido a partir do mesocarpo dos frutos da palma (*Elaeis guineensis*). Diferentemente dos demais óleos vegetais, apresenta consistência semissólida em temperatura ambiente e elevado teor de AGS. Possui alto teor, também, de carotenoides, tocoferois e tocotrienois. Na indústria de alimentos, no entanto, é utilizado em sua forma refinada, com retirada parcial ou total destes micronutrientes, em razão da alteração sensorial que esses componentes trazem ao produto final (MBA; DUMONT; NGADI, 2015).

Além de conferir as características sensoriais desejadas aos AUP, não possuir AGT, como as legislações exigem e, assim, permitir a inserção da expressão "zero *trans*" nas embalagens dos alimentos (agregando valor ao preço final do produto), o OPA é de fácil cultivo em regiões tropicais e temperadas e apresenta alta rentabilidade – é o óleo com maior produção por hectare plantado. Com todas essas características, o OPA atingiu o posto de óleo vegetal mais cultivado e comercializado no planeta, ultrapassando até mesmo o óleo de soja. Sendo assim, grande parte dos AUP da atualidade possuem OPA em sua composição (MBA; DUMONT; NGADI, 2015).

Apesar da significativa presença na alimentação humana na atualidade, os efeitos do OPA sobre a saúde ainda são controversos. O óleo é majoritariamente formado por ácido palmítico (C16:0), um AGS que pode apresentar efeitos adversos sobre a saúde. Ácido palmítico e OPA estão diretamente associados a inflamação por ativação dos receptores do tipo Toll 4 (TLR4) no tecido adiposo (MANCINI et al., 2015). Receptores de membrana TLR4, quando ativados por lipopolissacarídeos e/ou AGS, podem ativar duas vias. A primeira, via Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6); a segunda, via PI3K/AKT. Ambas as vias resultam na ativação do fator nuclear KB (NF-KB), levando à síntese de citocinas inflamatórias (SOARES et al., 2010; KORBECKI; BAJDAK-RUSINEK, 2019). Pode ocorrer, ainda, aumento da expressão da COX-2, enzima responsável pela síntese de prostaglandinas – outro mecanismo associado à inflamação (NÚÑEZ; CLEMENTE; GARCÍA, 2003). Ácido palmítico e OPA são também responsáveis por estimulação de mecanismos pró-inflamatórios por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando na ativação de citocinas como a IL- 1β , que diminui a resposta celular à insulina (MANCINI et al., 2015). Este processo pode ocasionar resistência à insulina e contribuir para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

Um estudo epidemiológico analisando dados de vinte e três países entre os anos de 1980 e 1997 revelou que, nos países desenvolvidos, cada quilograma adicional de OPA consumido se associou a mais dezessete óbitos por doença arterial coronariana e mais cinco óbitos por acidente vascular encefálico a cada 100.000 habitantes. Em países em desenvolvimento o painel se agrava: cada quilograma de OPA se associou a mais sessenta e oito óbitos por doença arterial coronariana e mais dezenove óbitos por acidente vascular encefálico a cada 100.000 habitantes (CHEN et al., 2011). Uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados utilizando suplementação com OPA e analisando o perfil lipídico como desfecho concluiu que, quando comparado a AGMI e AGPI, OPA apresentou efeitos adversos com elevação de colesterol total (CT) e lipoproteína de baixa densidade (LDL), agravados quando a análise foi estratificada por idade – o perfil lipídico de idosos parece ser mais impactado do que de adultos jovens (FATTORE et al., 2014).

Do ponto de vista agrotecnológico e financeiro, a utilização de OPA é vantajosa para a indústria por ser um óleo naturalmente semi-sólido em temperatura ambiente, sem necessitar de processamento adicional como a GI. A palma, no entanto, pode sofrer de amarelecimento fatal, uma doença de causa desconhecida que provoca secagem nas folhas, além de danos graves ao sistema radicular da planta (TEIXEIRA et al., 2017). O amarelecimento fatal pode gerar a perda da planta, causando prejuízo à safra. Como não é conhecida a etiologia e tampouco o tratamento dessa doença, a EMBRAPA desenvolveu a palma híbrida, uma alternativa à palma africana.

2.2.5 Óleo de palma híbrida

A palma híbrida é uma planta desenvolvida pela EMBRAPA a partir da hibridização de duas variações de palma: a palma africana (*Elaeis guineensis*) e a palma americana (*Elaeis oleifera*). A palma americana é uma variação não comercial, pois apresenta baixa produção de óleo por hectare comparada à variação africana. A variação americana, no entanto, possui resistência ao amarelecimento fatal e um óleo rico em ácido oleico (C18:1), um AG da classe dos monoinsaturados (LOPES; DA CUNHA; DE RESENDE, 2012). A hibridização gerou a palma híbrida, uma planta cujo óleo possui as mesmas características sensoriais do OPA, todavia apresenta menor teor de AGS e maior teor de AGMI (principalmente C18:1). Além disso, a palma híbrida possui maior resistência a pragas e ao amarelecimento fatal, comparada à palma africana. Com essas características, o OPH se mostra como potencial substituto para o OPA dos pontos de vista nutricional e agrícola (EMBRAPA, 2010).

O efeitos na saúde do OPH, no entanto, carecem de estudos científicos. Um ensaio clínico randomizado conduzido na Colômbia, com cento e sessenta indivíduos de ambos os sexos acima dos cinquenta anos de idade, dividiu os participantes em dois grupos: um recebendo suplementação com vinte e cinco mililitros de azeite de oliva (AO) e o outro recebendo suplementação com vinte e cinco mililitros de OPH. Verificou-se que, após três meses de suplementação, o CT e o LDL de ambos os grupos diminuíram significativamente, mas sem diferença entre os grupos (LUCCI et al., 2016).

Um outro estudo, publicado pelo mesmo grupo de pesquisa, analisou o perfil antioxidante plasmático dos participantes do ensaio clínico randomizado, por meio da mensuração do conteúdo fenólico total e pelos ensaios de Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) e Capacidade de absorbância dos radicais oxigenados (ORAC). Os dados apontaram elevação de fenólicos totais, TEAC e ORAC no plasma de ambos os grupos, sem diferença significativa entre eles (OJEDA et al., 2017). Os resultados de ambos os estudos levaram os pesquisadores a proferirem a alcunha de "equivalente tropical do AO" ao OPH.

É importante frisar que esses estudos em humanos foram realizados com OPH cru, o que não corresponde à realidade do consumo populacional. O óleo extraído da palma híbrida, assim como o da palma africana, é submetido ao refinamento antes de ser utilizado pela indústria alimentícia para a produção de AUP. Considerando que a ingestão de OPA e OPH pela população é majoritariamente via AUP (portanto, ambos os óleos refinados), um estudo conduzido em primatas não-humanos do gênero *Callithrix jacchus* avaliou o efeito da ingestão de OPA e OPH refinados em uma dieta hiperlipídica, mimetizando o padrão dietético ocidental. Os animais foram separados em dois grupos, um recebendo OPA e o outro OPH. Os resultados mostraram que ambos os óleos não alteraram o perfil lipídico dos primatas, entretanto, o OPH gerou hiperglicemia de jejum. Ambos os grupos desenvolveram acúmulo de gordura intrahepático, porém o grupo OPH apresentou elevação acentuada de enzimas transaminases plasmáticas e fibrose hepática. A palma híbrida modulou, ainda, a expressão de microRNAs envolvidos na transcrição de genes de vias do peroxissomo e de moléculas de adesão celular (SPREAFICO et al., 2018).

Tendo em vista os efeitos deletérios que o OPH promoveu sobre o tecido hepático em estudo experimental, nos parece cedo para afirmar que o OPH seja equivalente ao AO.

2.2.6 Azeite de oliva

O azeite de oliva é um óleo obtido a partir de extração das azeitonas, frutos da planta *Olea europaea*. É uma planta nativa da região mediterrânea do continente europeu, fazendo parte da cultura alimentar milenar dessa região. Conforme a maior parte dos óleos vegetais, o AO é líquido em temperatura ambiente. Isso se deve ao seu perfil de AG, majoritariamente formado por ácido oleico (C18:1). A extração ocorre seguindo etapas, começando pelo esmagamento e malaxação das olivas, separação sólida-líquida e, por fim, separação líquida-líquida (PERES; MARTINS; FERREIRA-DIAS, 2017; FOSCOLOU; CRITSELIS; PANAGIOTAKOS, 2018). Apesar do AO não ser normalmente utilizado na indústria de alimentos, tanto por ser líquido em temperatura ambiente quanto por possuir um custo elevado, é um óleo presente em todos os continentes e recentemente comparado ao OPH, o que faz valer sua menção.

O padrão alimentar da região do mediterrâneo europeu, popularmente conhecido como "dieta do mediterrâneo", vem sendo apontado como um padrão dietético importante na prevenção e no tratamento de diversas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT). Consiste essencialmente na elevada ingestão de AO, frutas, hortaliças frescas, grãos integrais e peixes. Uma meta-análise de estudos observacionais e ensaios clínicos randomizados publicada por Dinu e colaboradores em 2018, analisando dados de doze milhões e oitocentos mil indivíduos, apontou fortes evidências de que a adesão ao padrão mediterrâneo reduz o risco de mortalidade por todas as causas, além de reduzir o risco de desenvolvimento de DCV, câncer, doenças neurodegenerativas e *diabetes mellitus* tipo 2.

A maior parte dos dados referentes aos efeitos do AO são alusivos ao padrão mediterrâneo como um todo, no entanto há estudos também avaliando o efeito do AO isoladamente. Foscolou, Critselis e Panagiotakos (2018) relataram em uma revisão narrativa da literatura que os efeitos mais proeminentes do AO são na prevenção do desenvolvimento de DCV, redução de fatores de risco para DCV, otimização do perfil lipídico plasmático, modulação de marcadores inflamatórios e redução do risco de desenvolvimento de câncer. Os autores sugerem que os efeitos benéficos observados com o consumo de AO se devem não só ao seu perfil de AG (elevado em AGMI), como também à sua alta concentração de compostos fenólicos (tais como hidroxitirosol, oleuropeína e lignanas).

2.3 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO-ALCOÓLICA

2.3.1 Definição, etiologia e epidemiologia

De acordo com a American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), a DHGNA é definida como uma esteatose macrovesicular hepática crônica, que não seja secundária a distúrbios genéticos/metabólicos, a doenças infecciosas (como as hepatites virais), à iatrogenia farmacêutica, ao etilismo e à desnutrição. Atualmente, constitui a principal doença hepática que afeta a população mundial, e a segunda causa de indicação de transplantes hepáticos (CHALASANI et al., 2018).

Essa doença é crônica e, caso não tratada, pode progredir. Tanto a AASLD quanto a *European Association for the Study of the Liver* (EASL) definem a DHGNA como um espectro: inicialmente há acúmulo de gordura em pelo menos 5% dos hepatócitos, caracterizando a Esteatose; ela pode progredir e haver, além do acúmulo de gordura, inflamação lobular, dano celular e balonização de hepatócitos – um estado que caracteriza a Esteatohepatite Não-alcoólica (EHNA); caso haja perpetuação da inflamação, ocorrerá fibrose e necrose dos hepatócitos, gerando rigidez tecidual e falha nas funções hepáticas, ocorrendo então a Cirrose hepática; a Cirrose pode evoluir, ainda, para Carcinoma Hepatocelular, uma neoplasia do fígado (EASL; EASD; EASO, 2016; CHALASANI et al., 2018).

A resistência à insulina, a obesidade e a dislipidemia são achados clínicos associados ao desenvolvimento de DHGNA. As evidências apontam, inclusive, para uma inter-relação entre síndrome metabólica e DHGNA: uma pode ser tanto causa quanto consequência da outra (YKI-JARVINEN, 2014).

Estimativas da EASL (EASL; EASD; EASO, 2016) apontam que a prevalência de DHGNA é de 17 a 46% na população mundial. Araújo e colaboradores (2018) indicam prevalência média de 25% no planeta. Em obesos grau III, classificados de acordo com o Índice de Massa Corporal, a prevalência chega a ser maior que 95%, de acordo com a AASLD (CHALASANI et al., 2018).

Predisposição genética, apesar de ser apontada em apenas uma pequena parcela dos pacientes, pode também ser a causa da DHGNA. Alguns *Single-nucleotide polymorphisms* (SNP) foram identificados como possíveis promotores da doença, incluindo *Transmembrane 6 superfamily member 2* (TM6SF2) rs58542926 - variante K; *Patatin-like phospholipase domain-containing 3* (PNPLA3) rs738409 - variante M; e *Glucokinase regulator* (GCKR) rs1260326 - variante L. Estes genes estão envolvidos direta ou indiretamente na exportação de gordura do tecido hepático, logo esses polimorfismos comprometem esse processo e causam acúmulo de gordura intra-

hepática (STENDER et al., 2017). Dessa forma, a DHGNA pode estar presente em indivíduos eutróficos e sem resistência à insulina caso sejam portadores de algum desses SNP. Inclusive, a AASLD aponta prevalência média estimada de 7% em eutróficos (CHALASANI et al., 2018). Cabe, no entanto, ressaltar que o excesso de peso e os SNP podem atuar de forma sinérgica, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão da doença.

2.3.2 Fisiopatologia e diagnóstico

Por muito tempo, a DHGNA foi associada ao excesso de ingestão energética. Atualmente, no entanto, entende-se que a patogênese da doença é complexa e envolve diversos outros mecanismos. A enfermidade é definida como multifatorial, desenvolvida a partir da "*multiple-hit hypothesis*" (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016). Essa hipótese trata dos gatilhos para o desenvolvimento da DHGNA. O padrão dietético do indivíduo pode contribuir com vários desses gatilhos, como apontados na tabela 1.

	Fatores nutricionais	Mecanismo	
	Energia	Ganho de peso, ativação de vias lipogênicas	
		(EASL; EASD; EASO, 2016)	
	Carboidratos totais (especialmente refinados)	Hiperfagia, resistência à insulina, lipogênese <i>de novo</i> (BASARANOGLU et al., 2013)	
Execce	Frutose	Lipogênese <i>de novo</i> , hiperuricemia, redução d sensibilidade hepática à insulina por ativação d quinases <i>c-Jun N-terminal</i> (BASARANOGLU e al., 2013)	
LYCESSO	Lipídios totais	Acúmulo local de gordura, indução de expressão de citocinas inflamatórias (YASUTAKE et al., 2014)	
	Ácidos graxos saturados	Estresse do retículo endoplasmático, lipotoxicidade hepática, disfunção mitocondrial, apoptose (LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013)	
	Ácidos graxos poli- insaturados ômega 6	Indução de síntese de eicosanoides de alto poder inflamatório, contribuindo para a progressão da DHGNA (JUÁREZ-HERNANDEZ et al., 2015)	

Tabela 1. Aspectos nutricionais envolvidos na patogênese da DHGNA.

	Dieta hiperglicídica por compensação, danos	
Lipídios totais	relacionados ao excesso de carboidratos	
	(YASUTAKE et al., 2014)	
Ácidos graxos poli-	Baixa síntese de eicosanoides com menor poder	
insaturados ômega 3	inflamatório (SCORLETTI; BYRNE, 2013)	
Coline	Síntese aumentada de fosfolipídios, defeitos na	
	secreção de lipoproteínas, desregulação do ciclo	
Collina	da metionina, hiperhomocisteinemia (CORBIN;	
	ZEISEL, 2012)	
	Desregulação do ciclo da metionina,	
Deteíne	hipometilação do ácido desoxirribonucleico	
Detallia	(DNA), hiperhomocisteinemia (SOOKOIAN et al.,	
	2017)	
Metionina	Hipometilação do DNA (PACANA et al., 2015)	
	Baixa secreção de adiponectina, alta secreção de	
Vitamina D	resistina (KWOK; TORRES; HARRISON, 2013)	
	Resistência à insulina, recirculação	
Fibroo	enterohepática de xenobióticos por constipação,	
FIDIAS	excesso de peso, disbiose (PARNELL et al.,	
	2012)	
Ácidos graxos <i>trans</i>	Produção exacerbada de espécies reativas de	
(oriundos de óleos	oxigênio por oxidação na via do peroxissomo,	
vegetais	menor poder de oxidação mitocondrial	
	Lipídios totais Ácidos graxos poli- insaturados ômega 3 Colina Betaína Betaína Metionina Vitamina D Fibras	

DHGNA: Doença hepática gordurosa não-alcoólica.

Dessa forma, nota-se que o padrão dietético é um importante fator para o desenvolvimento da DHGNA. O padrão alimentar ocidental é rico em AUP (MONTEIRO et al., 2013). Estes tradicionalmente possuem excesso de carboidratos refinados e de lipídios totais, incluindo especialmente AGS, AGT e AGPI n-6 (GAINO et al., 2012). Esse perfil alimentar age em sinergia, promovendo obesidade. A relação entre AUP e DHGNA, no entanto, ainda não foi avaliada na literatura científica, carecendo de estudos.

De todos os fatores de risco elencados na *multiple-hit hypothesis*, o de maior relevância é a resistência à insulina. Ao mesmo tempo que a resistência à insulina eleva a lipogênese *de novo* no tecido hepático (formando AG a partir de glicose), nos adipócitos a insulina não consegue inibir a Lipase Hormônio Sensível. Na ausência de

inibição, essa enzima responsável pela lipólise, hidrolisa os TGs armazenados liberando AG livres no plasma. Sendo assim, a resistência à insulina gera fluxo duplo de AG para o tecido hepático, tanto via síntese no próprio tecido quanto via liberação adipocitária (BUGIANESI et al., 2010).

O acúmulo de lipídios intra-hepáticos gera lipotoxicidade por diversos mecanismos. O primeiro deles é via beta-oxidação incompleta ou oxidação via peroxissomos desses AG, gerando como consequência síntese elevada de ERO e, por conseguinte, estresse oxidativo no hepatócito. O excesso de AG pode, ainda, ativar as quinases *c-Jun N-terminal* (JNK), que por uma cascata de reações geram aumento na expressão de citocinas inflamatórias hepáticas (CUSI, 2009). Por fim, outra via já bastante estabelecida é a ativação do TLR4 exercida pelos AGS, como mencionado em capítulo anterior deste trabalho. A via TLR4/NF-KB/COX-2, dependente ou independente de MyD88, gera hipersecreção de citocinas inflamatórias e de prostaglandinas no tecido hepático (NÚÑEZ; CLEMENTE; GARCÍA, 2003; SOARES et al., 2010). Sharifnia e colaboradores (2015), inclusive, apontam que na EHNA há maior concentração de TLR4 nos hepatócitos, presumindo-se que há resposta inflamatória exacerbada nessa etapa da DHGNA. Todas essas vias geram como consequência disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo, o que contribui para a perpetuação e a progressão da DHGNA.

Para que se estabeleça o diagnóstico de DHGNA, a AASLD (CHALASANI et al., 2018) aponta que quatro critérios devem estar presentes: esteatose hepática confirmada por exame de imagem ou por histologia obtida por biópsia; indivíduo não possua consumo significativo de bebidas alcoólicas; não existam outros fatores etiológicos que também causem esteatose; não existam causas coexistentes de doença hepática crônica.

Apesar da biópsia ser o padrão-ouro para diagnóstico da DHGNA, representa técnica invasiva, que envolve custos hospitalares e riscos ao paciente. Dessa forma, exames de imagem emergiram como técnicas substitutivas no diagnóstico dessa doença. Os exames de imagem disponíveis para auxílio diagnóstico são a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética e a ultrassonografia (USG) (CHALASANI et al., 2018).

Como a DHGNA é uma doença de diagnóstico diferencial, cabe investiga-la clinicamente de forma minuciosa. Além de afastar causas secundárias de acúmulo de gordura intra-hepática, deve-se avaliar sinais e sintomas. No entanto, as manifestações clínicas da DHGNA geralmente são vagas. A maior parte dos portadores da doença é assintomática, enquanto outros relatam fadiga, mal-estar e/ou dor no quadrante superior direito. Hepatomegalia e *acanthosis nigricans* podem estar presentes. Icterícia, prurido

e ascite, que são sintomas clássicos de disfunção hepática, somente se manifestam em estágios mais avançados da DHGNA, como na Cirrose (EASL; EASD; EASO, 2016; CHALASANI et al., 2018).

A avaliação laboratorial também dá suporte ao diagnóstico, embora a resposta laboratorial dos pacientes com DHGNA seja heterogênea. A maior parte dos indivíduos com DHGNA não apresenta alteração significativa nas concentrações sanguíneas de Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA) e Gama-glutamil transpeptidase (GGT) (CHALASANI et al., 2018). Uma única alteração laboratorial é considerada típica da DHGNA, e diz respeito à razão AST/ALT. Razão menor que um indica lesão hepática não-alcoólica, enquanto maior que dois indica lesão hepática alcoólica. A interpretação dessa relação faz-se necessária para afastar etiologia alcoólica (WILLIAMS; HOOFNAGLE, 1988).

2.3.3 Modelos experimentais de DHGNA

Para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DHGNA e na progressão de esteatose hepática para EHNA ainda pouco elucidados, faz-se necessário investigar essa doença em modelos animais. A literatura sobre o assunto é vasta, com diversos autores abordando os existentes, que podem ser separados de acordo com a forma pela qual a doença é induzida, incluindo manipulação genética, indução química e intervenção dietética. A tabela 2 sintetiza as principais propostas empregadas na investigação de DHGNA em animais.

Manipulação genética	Indução química	Intervenção dietética
Camundongos transgênicos com	Estreptozotocina	Dieta deficiente em colina e
expressão aumentada de SREBP-1c		metionina
Camundongos <i>ob/ob</i>	Tetracloreto de carbono	Dieta aterogênica
Camundongos db/db	N-Nitrosodietilamina	Dieta rica em frutose
		Dieta hiperlipídica

Tabela 2. Modelos animais de indução de Doença hepática gordurosa não-alcoólica.

Dentre os modelos de intervenção dietética, as principais características são as seguintes:

- Dieta deficiente em colina e metionina

Constitui dieta que se caracteriza por apresentar elevado conteúdo de sacarose (aproximadamente 40% do valor energético total), com cerca de 10% de lipídios e fonte proteica manipulada, a fim de gerar deficiências de colina e metionina. A carência de ambos os compostos gera prejuízo à beta-oxidação de AG no fígado, distúrbios na exportação de AG via VLDL, gerando, consequentemente, rápido acúmulo de AG livres no tecido hepático. Essa dieta induz esteatose hepática, estresse oxidativo, necroinflamação e fibrose, além de infiltrado inflamatório no tecido hepático (BERTOLA, 2018).

Dessa forma, a histologia hepática de animais alimentados com dieta deficiente em colina e metionina é a que melhor se aproxima da EHNA em humanos. Há críticas, no entanto, ao restante do fenótipo dos animais. Ao contrário do cenário comumente encontrado em humanos com DHGNA, animais tratados com esse tipo de dieta apresentam perda de peso acentuada, caquexia, ausência de resistência à insulina e nenhuma alteração significativa em glicose, insulina, leptina e TAG plasmáticos em jejum (LAU; ZHANG; YU, 2017).

- Dieta aterogênica

Representa dieta que contém elevada concentração de colesterol (1-1,25% da formulação total) e de ácido cólico (0,5%). O modelo foi desenvolvido originalmente para investigação de aterosclerose em camundongos, pois além de promover aumento da absorção intestinal de colesterol e gordura, bloqueia a biotransformação de colesterol em ácidos biliares no tecido hepático. Dessa forma, gera elevação de CT e LDL, causando aterosclerose com o avançar da intervenção. Essas alterações metabólicas também cursam com esteatose hepática, inflamação e fibrose do tecido hepático, chegando ao balonamento dos hepatócitos após vinte e quatro semanas de intervenção (BERTOLA, 2018).

Os achados histológicos são bastante semelhantes à EHNA humana, entretanto, assim como a dieta deficiente em colina e metionina, causa perda de peso, não induz aumento dos compartimentos adiposos e não influencia a sensibilidade à insulina – um cenário oposto ao que é comumente encontrado na EHNA humana (TAKAHASHI; SOEJIMA; FUKUSATO, 2012).

- Dieta rica em frutose

Conforme mencionado em capítulo anterior, consumo excessivo de frutose constitui fator de risco para o desenvolvimento de DHGNA. Este monossacarídeo não depende da sinalização de insulina para ser internalizado no hepatócito, uma vez que

seu transporte se dá via *Glucose Transporter* 5 (GLUT5). Diferentes destinos metabólicos são reconhecidos para a frutose após sua internalização na célula hepática, destacando-se, entre eles, a lipogênese *de novo*, processo que também é independente do estímulo da insulina. A molécula participa da glicólise majoritariamente na forma de triose, formas químicas que independem da ação da glicoquinase e da fosfofrutoquinase, duas enzimas altamente reguladas alostericamente e que podem interromper a glicólise, gerando acúmulo de Acetil-Coenzima A) (BASARANOGLU et al., 2013). Promove, ainda, inibição da beta-oxidação mitocondrial de AG de cadeia longa e frutosilação de proteínas funcionais e estruturais, causando desarranjos e maufuncionamento de proteínas celulares (BERTOLA, 2018).

O desenvolvimento de DHGNA nos animais costuma ocorrer após oito semanas de intervenção dietética com dieta contendo entre cinquenta e cinco e setenta por cento do valor energético total de frutose, e acompanha o aumento do volume do tecido adiposo, a hiperglicemia e a hipertrigliceridemia – achados clínicos semelhantes aos presentes em humanos. Quanto às mudanças de massa corporal, dieta rica em frutose induz elevação, mas não tanto quanto glicose ou sacarose, ao passo que promove maior esteatose hepática quando comparada aos dois glicídios. Sendo assim, a dieta rica em frutose pode gerar DHGNA de forma mais intensa do que o ganho de massa corporal (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017).

- Dieta hiperlipídica

É um modelo experimental no qual os animais são alimentados com dietas contendo entre quarenta e cinco e setenta e cinco por cento do valor energético total composto por lipídios, que busca mimetizar a dieta ocidental. Esse excesso lipídico promove, inicialmente, ganho excessivo de massa corporal, com posterior indução de dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina. Subsequentemente, ocorre esteatose hepática – geralmente após oito semanas de intervenção dietética. Caso a oferta da dieta persista, a esteatose evolui para EHNA – em aproximadamente dezesseis semanas (VAN HERCK; VONGHIA; FRANCQUE, 2017).

Por induzir todas essas manifestações clínicas, semelhantes ao processo que geralmente ocorre em humanos, a dieta hiperlipídica é considerada o modelo com maior verossimilhança (NAKAMURA; TERAUCHI, 2013; BERTOLA, 2018). Cabe destacar, no entanto, que os protocolos de dieta hiperlipídica utilizam, majoritariamente, banha de porco como fonte lipídica (KUCERA; CERVINKOVA, 2014), o que não corresponde à ingestão dietética da maior parte da população. Como discutido anteriormente, OPA é

a gordura de maior consumo no planeta. Sendo assim, faz-se necessário investigar esse modelo de DHGNA utilizando OPA – e sua variação, OPH – como substrato lipídico.

2.3.4 Lipídios e DHGNA

Os estudos envolvendo lipídios e DHGNA são mais voltados para o tratamento dessa doença. Investigações que avaliem a influência dos lipídios no desenvolvimento e na progressão da DHGNA, no entanto, são escassos. Alguns deles investigam o efeito de AG isolados ou de óleos que não fazem parte da cultura alimentar global (como óleo de *krill*) (FERRAMOSCA; ZARA, 2014). Como discutido anteriormente, consumo excessivo de AGS é um potencial gatilho para o desenvolvimento de DHGNA. Modelos experimentais que avaliam o efeito dos AGS no desenvolvimento e na progressão de DHGNA utilizam o modelo de dieta hiperlipídica ou modelo misto, com dieta hiperlipídica e rica em frutose. Esses estudos, no entanto, empregam primordialmente banha de porco como fonte lipídica rica em AGS.

No que tange aos óleos vegetais, tema do presente trabalho, Go e colaboradores (2015) avaliaram a influência de OPA no acúmulo de lipídios no tecido hepático de ratos *Sprague Dawley* machos adultos, comparado ao óleo de girassol (rico em AGPI n-6). Os animais foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada, todos recebendo dieta padrão isoenergética por vinte e dois dias, sendo que em três deles foram administrados oralmente algum óleo vegetal como suplementação. Em um, 2,5 ml de OPA, em outro 2,5 ml de óleo de girassol, e no terceiro 1,25 ml de OPA e 1,25 ml de óleo de girassol. O quarto grupo, portanto, foi o controle. Análise histológica do tecido hepático apontou considerável acúmulo de lipídios nos animais que receberam OPA, o que não foi observado naqueles tratados com óleo de girassol. O grupo que foi ofertado a mistura dos óleos apresentou acúmulo intermediário, condizente com a quantidade de OPA administrada. Interessante notar que nesse estudo os óleos não alteraram o perfil lipídico sanguíneo dos animais, então os autores sugeriram que OPA pode induzir alterações no metabolismo hepático antes mesmo de causar qualquer alteração nas lipoproteínas e nos TAG circulantes.

Comparando-se OPA e OPH na DHGNA há apenas um estudo, publicado por Spreafico e colaboradores (2018). Nessa investigação, vinte primatas do Novo Mundo, adultos de ambos os sexos, foram separados em dois grupos: um recebendo dieta hiperlipídica contendo OPA, enquanto o outro recebia dieta hiperlipídica à base de OPH durante três meses. Novamente, nenhum dos óleos induziu alterações no perfil lipídico plasmático, no entanto promoveram severas alterações no metabolismo hepático. Ambos os grupos apresentaram aumento do volume hepático, com efeito mais
pronunciado no grupo que se alimentou com OPH. Os animais tratados com OPH, comparados ao OPA, apresentaram, ainda, valores significativamente mais elevados relativos à razão AST/ALT, glicemia de jejum e expressão gênica da enzima Ácido Graxo Sintase, além de HNF-4α. Os autores concluíram, portanto, que ambos os óleos promoveram esteatose hepática, mas OPH induziu efeitos mais proeminentes comparado ao OPA.

Quanto ao AO, estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos apontam que, quando considerado como alimento parte da dieta mediterrânea, este óleo pode contribuir para a prevenção de DHGNA (TROVATO et al., 2019). Avaliado isoladamente em dietas hiperlipídicas em animais, no entanto, os dados são controversos. A administração de AO em animais pode induzir esteatose hepática, a depender da quantidade e do tempo de intervenção. O mecanismo pelo qual isso ocorre, contudo, não está bem esclarecido. Ferramosca e Zara (2014) sugerem que o excesso de AO impede a correta oxidação de AG na mitocôndria hepática e que mais estudos são necessários para elucidar essas rotas metabólicas.

Trovato e colaboradores (2018) mostraram que, em ratos alimentados por dez semanas com dieta hiperlipídica contendo AO, houve esteatose hepática, com expressão acentuada da citocina pró-inflamatória IL-1, com efeitos agravados em animais que também possuíssem deficiência de vitamina D. No entanto, AO reduziu a concentração de *Insulin Growth Factor* 1 (IGF-1) e da proteína *Dickkopf* 1 (Dkk-1). Tanto IGF-1 quanto Dkk-1 são marcadores associados à síntese de colágeno no tecido hepático. Dessa forma, os autores sugeriram que mesmo induzindo esteatose hepática, AO reduz a síntese de colágeno no fígado, protegendo contra a progressão para EHNA.

Esses achados são corroborados pelo artigo de revisão publicado por Soto-Alarcón e colaboradores (2018), no qual os autores apontam que o AO protege o fígado contra danos celulares por ativar defesas antioxidantes (via *Nuclear Transcription Factor Erythroid-Derived 2-like 2* – Nfr-2), prevenir inflamação local (via inativação de NF-KB) e inibir estresse do retículo endoplasmático (via inibição de *Protein kinase-like ER kinase* – PERK). Cabe ressaltar que os efeitos benéficos referidos são parcialmente explicados pela elevada concentração de compostos bioativos no AO (como hidroxitirosol e oleuropeína), e não apenas por sua composição de AG (rica em AGMI).

Djohan e colaboradores (2018) compararam OPA e AO, por meio da oferta desses óleos em dietas hiperlipídicas (cinquenta e seis porcento do valor energético total de gordura) para ratos *Wistar* adultos machos durante doze semanas. Enquanto OPA induziu distúrbios na tolerância à glicose, AO promoveu acúmulo de lipídios intrahepáticos. Ambos os grupos apresentaram maior expressão de PPARγ no fígado, comparados ao grupo controle (ou seja, maior captação de AG pelo tecido hepático).

No entanto, somente AO induziu maior expressão de SREBP-1c (fator nuclear associado à síntese endógena de AG).

Conclui-se, portanto, que a literatura é escassa acerca dos efeitos de OPA, OPH e AO no desenvolvimento e na progressão de DHGNA. Considerando que estes estão entre os óleos mais consumidos no planeta, faz-se necessário investigar os efeitos desses óleos sobre o desenvolvimento desta enfermidade.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A ingestão de alimentos industrializados faz parte dos hábitos alimentares da população mundial. Os AGT presentes nesse tipo de alimento estão associados ao desenvolvimento de DCV, o que resultou em iniciativas para a substituição da GVPH por fontes lipídicas isentas de AGT produzidos industrialmente. Por conta disso, a fabricação de AUP na atualidade utiliza três principais lipídios: GI, OPA e OPH. Os efeitos metabólicos no tecido hepático desses óleos e gorduras, no entanto, são ainda pouco descritos.

Observa-se, ainda, aumento na prevalência de DHGNA em nível global nas últimas décadas. Apesar de ser uma doença crônica grave, sua etiologia e as causas para sua progressão não são totalmente conhecidas. Entende-se que certos fatores nutricionais isolados podem gerar efeitos positivos ou adversos sobre esta enfermidade, a depender do contexto e do nutriente em questão.

Dessa forma, o presente trabalho justifica-se pela falta de investigação acerca da relação entre OPA, OPH, AO e DHGNA. Pretende-se, portanto, investigar a hipótese de que, em modelo experimental com camundongos adultos submetidos a dieta hiperlipídica, OPA e OPH induzem DHGNA, quando comparados tanto a uma dieta isoenergética padrão quanto à ingestão de dieta hiperlipídica contendo AO.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar, em camundongos C57BL/6 machos adultos, o efeito da ingestão de dietas hiperlipídicas contendo OPA, OPH ou AO sobre o desenvolvimento de DHGNA.

4.2 Objetivos específicos

Em camundongos machos adultos, alimentados durante oito semanas com dietas hiperlipídicas contendo OPA, OPH ou AO, avaliar:

- Enzimas de função hepática e perfil lipídico plasmáticos;
- Consumo alimentar, ganho ponderal, adiposidade e volumetria hepática;
- Concentração de gordura hepática e grau de lesão hepática;
- Alterações no transcriptoma hepático.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e dietas experimentais

Lipídios

Foram utilizados vinte e quatro camundongos (*Mus musculus*) adultos (sessenta dias) machos da linhagem C57BI/6, mantidos no Biotério de Roedores do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O cálculo amostral foi realizado no software *Power and Sample Size* (HYLOWN CONSULTING LLC), considerando-se poder estatístico de 95%. Os animais foram mantidos em gaiolas de dimensões 30x18x13cm, com três animais por gaiola. O acesso a água e ração foi *ad libitum*.

Os animais foram separados em quatro grupos experimentais, contendo seis em cada: grupo Controle (GC), recebendo ração comercial padrão *(Laboratory Rodent Diet - LabDiet®);* grupo Palma Africana (GPA), com ração hiperlipídica elaborada com OPA; grupo Palma Híbrida (GPH), com ração hiperlipídica elaborada com OPH; e grupo Azeite de Oliva (GAO), com ração hiperlipídica elaborada com AO. Todas as rações foram confeccionadas seguindo as recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES et al., 1993). As dietas hiperlipídicas foram formuladas de forma idêntica, diferindo apenas na fonte lipídica utilizada (Pragsoluções Biociências®, SP, Brasil). As quilocalorias (kcal) totais e a composição de ácidos graxos das dietas na tabela 4. Durante a investigação, foram armazenadas em embalagens opacas em freezer à temperatura de vinte ^oC negativos, a fim de se evitar a oxidação dos ácidos graxos presentes.

Kcal/100g	422,08
Proteínas	16%
Carboidratos	43%

Tabela 3. Conteúdo energético total e distribuição percentual de macronutrientes dasrações GPA, GPH e GAO.

Kcal: quilocalorias; GPA: Grupo Palma Africana; GPH: Grupo Palma Híbrida; GAO: Grupo Azeite de Oliva

41%

Ácidos graxos (%)	GPA	GPH	GAO		
	AGS				
Palmítico (C16:0)	35,88 ± 0,02	$30,68 \pm 0,30$	$13,42 \pm 0,06$		
Esteárico (C18:0)	$5,55 \pm 0,01$	$5,23 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,25$		
∑AGS	45,25 ± 0,13	39,20 ± 0,31	18,13 ± 0,65		
	AGMI				
Oleico (C18:1 9c)	37,11 ± 0,01	41,64 ± 0,15	$67,80 \pm 0,00$		
∑ AGMI	43,90 ± 0,01	47,72 ± 0,34	70,34 ± 0,51		
	AGPI				
Linoleico (C18:2 9c 12c)	9,83 ± 0,16	11,23 ± 0,40	10,45 ± 0,08		
Araquidônico (C20:4 5c 8c 11c 14c) $0,08 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	0,03 ± 0,01		
∑ AGPI n-6	10,11 ± 0,26	11,65 ± 0,21	10,67 ± 0,13		
Alfa-linolênico (C18:3 9c 12c 15c)	$0,54 \pm 0,03$	1,04 ± 0,01	$0,42 \pm 0,00$		
Eicosapentaenoico	0.11 + 0.00	0.12 . 0.00	0.05 . 0.00		
(C20:5 5c 8c 11c 14c 17c)	$0,11 \pm 0,00$	$0, 12 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$		
Docosahexaenoico	0.02 + 0.01	0.01 + 0.00	0.00 . 0.00		
(C22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c)	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$		
∑ AGPI n-3	0,69 ± 0,05	1,25 ± 0,08	0,86 ± 0,04		
∑ AGPI	10,82 ± 0,31	12,93 ± 0,13	11,53 ± 0,09		

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos das rações GPA, GPH e GAO.

∑: somatório; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; GPA: Grupo Palma Africana; GPH: Grupo Palma Híbrida; GAO: Grupo Azeite de Oliva.

5.2 Desenho experimental

O protocolo experimental durou oito semanas. No primeiro dia foram avaliadas massa corporal, adiposidade corporal e volumetria dos fígados por TC. Massa corporal e consumo de ração foram monitorados ao longo de todo o experimento, com avaliações semanais. Ao fim da intervenção avaliou-se massa corporal, adiposidade corporal e volumetria dos fígados novamente, com subsequente eutanásia e coletas de sangue, tecido hepático, tecido adiposo retroperitoneal e de tecido adiposo inguinal. Em todos os procedimentos os animais foram submetidos a jejum prévio de quatro horas. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, sob o número 049/17 no dia dez de julho de 2017, conforme Anexo A.

5.3 Avaliação da massa corporal e do consumo dietético

A massa corporal foi avaliada semanalmente por meio de balança digital com precisão de 0,01 g. A avaliação do consumo alimentar foi realizada três vezes por semana, com medida do peso da ração ofertada e posterior medida da ração restante na gaiola. Subtraiu-se a sobra pela oferta e dividiu-se pelo número de dias no espaço de tempo avaliado, obtendo-se o consumo médio por gaiola.

5.4 Adiposidade e volumetria hepática

A adiposidade corporal e o volume hepático foram mensurados por meio de tomografia computadorizada, realizada imediatamente antes do início e no último dia da intervenção. Os animais foram sedados utilizando-se Cloridrato de Cetamina cem mg/kg e Cloridrato de Xilazina dez mg/kg com aplicação intraperitonial, conforme recomendações (GREEN et al., 1981). Após sedação, foram posicionados para avaliação tomográfica em equipamento Optima PET/CT560®, localizado no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF da UFRJ. As tomografias foram realizadas utilizando-se cento e quarenta kVa, trezentos e vinte mAs e cortes de sessenta e dois mm. Para fins de calibração do equipamento com as unidades de Hounsfield específicas, realizou-se tomografia de amostras de tecidos adiposos retroperitonial e mesentérico. A adiposidade corporal e o volume hepático foram calculados utilizando-se software AW4.6.

5.5 Coleta de sangue e de tecidos

Transcorridas as oito semanas de intervenção, após quatro horas de jejum, os animais receberam anestésicos injetáveis (Cetamina e Xilazina) com doses elevadas em aplicação intraperitonial, conforme orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – três vezes a dose requerida para anestesia geral: Cloridrato de Cetamina trezentos mg/kg e Cloridrato de Xilazina trinta mg/kg (BRASIL, 2013). A seguir, foi realizada exsanguinação por punção cardíaca e armazenamento do sangue em tubos de dois ml. Os tubos foram imediatamente submetidos à centrifugação por quinze minutos, em cinco °C e três mil rpm, para separação do soro e armazenados em freezer a oitenta °C negativos.

5.6 Avaliação laboratorial do soro

As amostras de soro foram utilizadas para analisar as concentrações de glicose, perfil lipídico (CT, lipoproteína de alta densidade (HDL), LDL, VLDL e TAG) e marcadores de função hepática (AST, ALT, FA e GGT). Glicose foi quantificada por método enzimático em analisador automático, perfil lipídico por método colorimétrico e marcadores de função hepática por método cinético automatizado. Todas as avaliações foram realizadas em autoanalisador Metrolab 2300 – Wiener®, no laboratório Laborlife Análises Clínicas® – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

5.7 Histologia do tecido hepático

Oito animais, sendo dois de cada grupo, foram escolhidos aleatoriamente para análise histológica. Aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi separado em cortes de dois a seis mm e fixado em formaldeído dez por cento por vinte e quatro horas. A seguir as amostras foram desidratadas em álcool etílico cem por cento, clarificadas em Xilol, submetidas ao processo de inclusão por parafina, segmentadas em micrótomo, com cortes de dez µm, e coradas com Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram digitalizadas utilizando scanner (Pannoramic MIDI – 3D Histech®) e empregadas na avaliação do grau de esteatose, inflamação e vacuolização nuclear. Os resultados foram aplicados no *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score* (NAS) por patologista experiente para aferir o grau de lesão hepática e identificar o estágio da DHGNA (KLEINER et al., 2005).

5.8 Concentração de gordura no fígado

Duzentos miligramas de amostras de fígado de cada animal foram utilizados para determinação da concentração de gordura hepática. Após homogeneização, adicionouse um ml de clorofórmio e dois ml de metanol, agitou-se o béquer manualmente e com posterior adição de um ml de clorofórmio e um ml de água destilada. Deixou-se o béquer em agitador mecânico por quinze minutos, com consequente filtragem da solução em papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Após pesagem de tubo de vidro, adicionou-se a camada inferior da solução bifásica. Com auxílio de gás nitrogênio, houve a promoção da evaporação do solvente, e então levou-se os tubos para a estufa, a noventa e cinco ^oC por duas horas. Após resfriamento em dessecador, ocorreu nova pesagem do tubo. A quantidade de gordura na amostra foi determinada pelo peso do tubo após o experimento subtraído do peso do tubo vazio, com resultado expresso em valor percentual (BLIGH; DYER, 1959).

5.9 Transcriptômica hepática

Os ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA) totais das amostras de fígado dos animais foram extraídos utilizando kit PrepEase, Affymetrix®, seguindo o método indicado pelo fabricante. A quantificação dos mRNA foi determinada por meio de espectrofotômetro NanoDrop-1000®, com pureza estimada pelo cálculo das razões 260/280 nm e 260/230 nm.

A análise dos transcritos foi realizada em parceria com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS, Brasil. Empregou-se o sistema *Experion* de eletroforese automática (Bio-Rad®) e chip para RNA com sensibilidade padrão. Foram utilizados RNA de alta qualidade (integridade \geq 7,5) para a preparação de mRNA. O sequenciamento foi realizado por meio de equipamento Illumina HiSeq2000®, com capacidade para leitura de 2x100 bases. A aplicação de softwares de bioinformática para análise dos dados foi feita em parceria com o *Laboratory of Epigenetics of Lipid Metabolism* do *Instituto Madrileño de Estudios Avanzados* (Madri, Espanha).

5.10 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, com posterior análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, ou análise de Kruskal-Wallis com teste de Dunn, utilizando-se o software GraphPad Prism versão 7. O nível de significância foi fixado em 5% ($p \le 0,05$) e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados da presente dissertação foram publicados na revista International Journal of Molecular Sciences, com fator de impacto 4.183. O artigo intitulado "Olive Oil, Palm Oil and Hybrid Palm Oil Distinctly Modulate Liver Transcriptome and Induce NAFLD in Mice Fed a High-Fat Diet" está transcrito a seguir e a versão publicada na revista consta no Anexo B.

Olive Oil, Palm Oil and Hybrid Palm Oil Distinctly Modulate Liver Transcriptome and Induce NAFLD in Mice Fed a High-Fat Diet

Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is high prevalent worldwide. The most severe form is Nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Among risk factors for the development of NAFLD is excessive lipid intake. Since Palm (P) oil is the most consumed oil in the world, we aimed to investigate the effects of high-fat diets made with P oil, Hybrid Palm (HP) oil or Olive (O) oil in liver. 24 male mice (C57BI/6J) were fed high-fat diet (41% fat) containing P, HP or O oils for 8 weeks and compared to a Control (C) group, fed chow diet. Adiposity was measured with computed tomography. Body, adipose tissue and liver weights, as well as liver fat (Bligh-Dyer), blood lipid profile, glucose and liver enzymes were measured. Liver histology (Hematoxylin-Eosin) and transcriptome (microarray-based) were performed. ANOVA test with Newman-Keuls were used. Body weight was increased in P group (p<0.001) and body fat in O group (Cvs.O p≤0.01, Pvs.O p≤0.05, HPvs.O p≤0.05). All high-fat diets disturbed blood lipid profile and glucose, with marked effects of HP on VLDL, triglycerides and alkaline phosphatase (p≤0.001). HP had the highest liver fat (42.76±1.58), followed by P (33.94±1.13). O had fat amount comparable to C (16.46±0.34, 14.71± 0.70, respectively). P and HP oils induced hepatocyte ballooning. Transcriptome alterations of O group were related to amino acid metabolism and FA metabolism. P group to calcium ion homeostasis and HP oil to protein localization. Both P and HP oils induced NASH in mice via disturbed hepatocyte transcription. This raises concern about the content of these oils in several industrialized foods.

Keywords: NAFLD; NASH; Olive oil; Palm oil; Hybrid Palm oil; High-fat diet; Transcriptomics

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a broad-spectrum disease, which encompasses from liver steatosis (nonalcoholic fatty liver – NAFL) to inflammation, often with fibrosis (nonalcoholic steatohepatitis - NASH). NASH has been identified as an important risk factor for the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. This disease is highly associated with lifestyle, with both obesity and metabolic syndrome playing a central role in the ascending prevalence observed nowadays [2,3]. According to recent data, NAFLD is estimated to affect 25% of adult people worldwide [4]. Although those evidences raise concern about the impact of NAFLD in the world, the data available at the moment cannot explain some of the molecular mechanisms involved in

the progress of this disease [5]. Therefore, efforts must be made to elucidate the gaps in the knowledge.

Among the known risk factors for the development of NAFLD, inadequate dietary habits are recognized as pivotal [6]. Excessive lipid intake, specifically, seems to be associated with accumulation of fat in animal liver [7], and also in epidemiologic [8] and human intervention [9] studies. Regarding mice, the use of high-fat diet is the preferable model, since phenotype of NAFLD developed by this model resembles best human NAFLD. [7,10] As extensively reviewed by Kakimoto & Kowaltowski (2016) [11], high-fat diets can induce accumulation of fat in liver (steatosis), even with no changes in body weight. Several studies reported that insulin signaling impairment and excess production of reactive oxygen species are the main molecular mechanisms involved in accumulation of fat in liver tissue. [7,10,11] The type of fat is mainly important, as in vitro evidence shows that different kinds of fatty acids (FA) exert distinct effects on hepatocytes [12]. In a recent study, we have shown that subjects with advanced liver fibrosis had higher levels of saturated palmitic and stearic fatty acids, as well as oleic acid and total monounsaturated fatty acids (MUFA) in erythrocytes [13]. In fact, FAs are, today, described not only as energy sources, but also as important signaling mediators in several metabolic pathways [14]. In hepatocytes, FAs modulate gene expression through the activation of Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), Sterol-regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), Toll-like receptors (TLR), among others [15]. In vivo and human studies regarding the effect of fats and oils in the development of NAFLD, however, are scarce. Most of studies in animal models focus on the outcomes of lard diet consumption [16], an animal source of saturated fatty acids [17], albeit the most consumed lipid in the world in the recent years is palm (P) oil [18].

P oil is extracted from the mesocarp of the fruit derived from the palm tree, *Elaeis guineensis*. The oil is rich in saturated fatty acids, especially palmitic acid – unlike most of the vegetable oils, which are rich in unsaturated fatty acids [19]. For this reason, P oil is semisolid in room temperature, making it suitable for the formulation of ultraprocessed food, such as ice cream, cakes and shortenings [20]. In order to improve the resistance to plagues and the production per hectare, researchers crossbred *Elaeis guineensis* with *Elaeis oleifera*, a variation of the palm tree, developing a new type of palm capable of generate an oil with the same characteristics of P oil, but with superior yield: the hybrid palm (HP) oil [21].

Some authors suggested that, because of the positive effects of HP oil supplementation in blood lipids and antioxidant capacity in humans, and also due to its higher content of oleic acid (a MUFA) and decreased content of palmitic acid, compared to P oil, it should be called "the tropical equivalent of olive oil" [22,23]. Evidence to support this is scarce, however. Concerning the liver, recent data have shown that marmosets fed a high-fat diet containing P or HP oils developed NAFLD, and animals fed HP diet demonstrated an even higher level of damage to the liver when compared to the group that consumed P [24].

In this scenario, it is critical to investigate the effects of P and HP oils as possible triggers to the development of NAFLD, since the consumption of ultraprocessed foods – rich in both oils – is increasing worldwide [25]. It is vital, also, to compare the effects of HP with olive (O) oil. The aim of the present study is to investigate the effects of high-fat diets containing P, HP and O oils in the liver and the genetic modulation that these oils perpetrate as a mechanism to develop NAFLD.

2. Results

2.1. Body weight and adipose tissue

To assess the dietary impact on body composition, body weight and body fat were measured after 8 weeks of feeding. P group showed increased body weight compared

to Control group (C), HP and O ($p \le 0,001$, Figure 1A). However, when body fat was assessed, surprisingly the O group demonstrated higher fat content in relation to the three groups (C vs O $p \le 0,01$, P vs O $p \le 0,05$, HP vs O $p \le 0,05$, Figure 1B). After an adjustment in the analyzes, separating adipose tissue compartments, O group showed substantially more subcutaneous fat than all others (C vs O $p \le 0,01$, P vs O $p \le 0,05$, Figure 1C), as well as increased visceral fat compared to C group ($p \le 0,05$, Figure 1D).



Figure 1. Impact of experimental diets on animals' body weight (A), body fat (B), subcutaneous adipose tissue (C) and visceral adipose tissue (D). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * = p ≤0.05; ** = p ≤0.01; *** = p ≤ 0.001. C = Control group; O = Olive oil group; P = Palm oil group; HP = Hybrid Palm oil group.

2.2. Adiposity measurement by computed tomography (CT) in mice

To further investigate adipose tissue depots from baseline to completion of the 8week study, we applied CT-scan and ImageJ 1.51u software to segment adipose tissue in the tomographic images, which made it possible to follow up groups throughout the study. The O oil group showed greater accumulation of adipose tissue after two months of diet (Figure 2D), followed by the P group (Figure 2F); and HP group (Figure 2H). C group showed no significant gain of body fat in two months (Figure 2B).



Figure 2. Axial tomographic slices between L4 / L5 per dietary group, window levels (WL) -173 HU to -109 HU. Segmentation of body fat (region in red) by ImageJ on the scale referring to adipose tissue of the animals. A - Control group (initial moment); B - Control group (2 months of diet); C - Olive oil group (initial moment); D - Olive oil group (2 months of diet); E - Palm oil group (initial moment); F - Palm oil group (2 months of diet); G - Hybrid Palm oil group (initial moment); H - Hybrid Palm oil group (2 months of diet).

2.3. Biochemical and liver analyses

Regarding serum metabolic parameters, the three high-fat diets increased total cholesterol compared to C group, with both O and HP groups demonstrating the highest values (C vs O p ≤ 0.01, C vs P p ≤ 0.05, C vs HP p ≤ 0.01, Figure 3A). This increase in total cholesterol may be explained by the rise in serum HDL cholesterol (C vs O p ≤ 0.001, C vs P p ≤ 0.01, C vs HP p ≤ 0.001, Figure 3B) promoted by all high-fat diets, whilst no change was observed in serum LDL cholesterol concentration (Figure 3C). VLDL cholesterol, on the other hand, behaved differently, with higher concentrations being observed only in HP group compared to others (p ≤ 0.001, Figure 3D), as well as triglycerides concentration (p ≤ 0.001, Figure 3E). Nevertheless, glucose levels were markedly affected by diets. Comparing to control, all high-fat diets promoted increase in serum glucose concentration, with O and P groups behaving similarly (C vs O p ≤ 0.01, C vs P p ≤ 0.01, Figure 3F), while the HP group showed the highest concentration (C vs HP p ≤ 0.001, O vs HP p ≤ 0.05, P vs HP p ≤ 0.05, Figure 3F), suggesting a possible correlation between higher VLDL, triglycerides and glucose in HP group.



Figure 3. Changes in serum parameters according to each diet. Total cholesterol (A); HDL cholesterol (B); LDL cholesterol (C); VLDL cholesterol (D); Triglycerides (E); Glucose (F). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * = p ≤0.05; ** = p ≤0.01; *** = p ≤ 0.001. C = Control group; O = Olive oil group; P = Palm oil group; HP = Hybrid Palm oil group.

Serum liver biomarkers, showed in Figure 4, revealed that HP diet promoted an increase in Aspartate aminotransferase / Alanine aminotransferase ratio (AST/ALT) in relation to P diet (P vs HP p \leq 0,05, Figure 4A). Concerning Alkaline phosphatase, a remarkably increase was observed when we compared HP to other groups (p \leq 0.001, Figure 4B). Gamma-glutamyl transferase, however, did not differ between HP and other groups, with O and P groups exhibiting lower concentrations in relation to control (C vs O p \leq 0.01, C vs P p \leq 0.01, Figure 4C). We also measured total liver weight and performed a comparison of liver weight / body weight ratio between groups, in order to investigate whether diets promote proportionally an increase in this indicator. The results evidenced that P and HP diets significantly increased this ratio when compared to both C and O groups (p \leq 0.001, Figure 4D), whereas O group unexpectedly showed a lower ratio compared to C group (p \leq 0.001, Figure 4D), suggesting that the O diet did not promote increase in liver size and weight.



Figure 4. Effects of each diet on liver dynamics. (A), AST / ALT ratio; (B), Alkaline phosphatase; (C), Gamma-glutamyl transferase; (D), Liver weight / body weight ratio. Data presented as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * = p ≤0.05; ** = p ≤0.01; *** = p ≤ 0.001. AST = Aspartate aminotransferase; ALT = Alanine aminotransferase; C = Control group; O = Olive oil group; P = Palm oil group; HP = Hybrid Palm oil group.

Based on these data, we also investigated whether these changes in serum biomarkers and liver weight were due to accumulation of fat in liver tissue. For this reason, we performed a Bligh-Dyer assay to quantify fat concentration in liver tissue of all animals (Table 1). The analyzes revealed that P and HP groups had substantially higher levels of liver fat (33.94 ± 1.13 and 42.76 ± 1.58 , respectively), with great statistical difference among groups (p ≤ 0.0001). The higher levels of liver fat in HP group could be an indicative that this diet-induced fat accumulation in the liver potentially caused liver damage, thus resulting in elevation of liver enzymes, as demonstrated in Figure 4.

Group	Liver fat (%)	Statistical significance versus Control	Statistical significance versus Olive oil	Statistical significance versus Palm oil	Statistical significance versus Hybrid Palm oil
Control	14.71± 0.70	-	p = 0.1189	p < 0.0001	p < 0.0001
Olive oil	16.46 ± 0.34	p = 0.1189	-	p < 0.0001	p < 0.0001
Palm oil	33.94 ± 1.13	p < 0.0001	p < 0.0001	-	p < 0.0001
Hybrid Palm oil	42.76 ± 1.58	p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.0001	-

 Table 1. Liver fat measurements in mice submitted to high-fat diets protocol

 (%).

Measured by Bligh-Dyer method; Data presented as means. \pm standard error of the mean (n = 6).

2.4. Histological Analysis

P, HP and O groups showed higher amounts of lipid vacuoles. Quantification of inflammatory infiltrate, neovascularization and nuclear vacuolization was observed in greater amount in the HP group (Figure 5). In addition, P and HP groups showed a possible hydropic degeneration (ballooning), characterized by the accumulation of water in the intracellular environment due to loss of the cell's ability to maintain ionic balance and fluid homeostasis. NAFLD activity score (NAS) was performed in all groups (Table 2) and revealed that the O group histology resembles non-NASH NAFLD (score 3), whereas the P and HP groups showed NASH pattern (score 5 for both).



Figure 5. Histological analyses with hematoxylin-eosin stain of the liver revealed damage induced by high-fat diets, according to the lipid offered: (A), Control group; (B), Olive oil group; (C), Palm oil group; (D), Hybrid Palm oil group. Arrow: lipid vacuoles; Arrowhead: inflammatory infiltrate; Asterisk: nuclear vacuolization; Hash symbol: hydropic degeneration.

Group	Grade of steatosis	Lobular inflammation	Ballooning	NAFLD activity score
Control	1	0	0	1
Olive oil	1	2	0	3
Palm oil	2	2	1	5
Hybrid Palm oil	2	2	1	5

 Table 2. NAFLD activity score (NAS) based on histological analyses

2.5. Transcriptomic analyses

To determine whether the above-mentioned changes in biochemical parameters modify liver gene expression, we next analyzed the transcriptome of liver mice consuming different types of diets. Whole transcriptome was performed using microarrays gene expression (Figure 6). Cluster analysis showed that diets containing high-fat differed from control (Figure 6A), while P and HP groups were more similar in gene expression than O group. Mice consuming O showed a large amount (2479) of differentially expressed genes (DEG) from which 1781 were up-regulated and 698 down-

regulated. By contrast, P group showed the lowest amount of liver transcript changes (168), from which 62 were up-regulated and 106 downregulated. We also found that HP group had the highest number (2529) of DEG, of which 1817 up-regulated and 712 were down-regulated. Some of the DEG were common in two or three groups (Figure 6E). Common transcripts between O and P groups include adgrb3, nrp2, olfr1222, cspr2, slxl1, dppa2, spin2d, vmn1r114, vmn1r158, vpreb1, among others. Common transcripts between P and HP groups include acot9, mrpl32, baiap2, casq2, rpp25, dis3l2, fastkd1, foxo1, irgm1, and lsm1. Common genes among O and P groups include more than 1300 genes.



Figure 6. Liver gene expression analysis. (A) Heatmap of microarrays data of different dietary groups. Scatter plots in mice liver receiving either Olive oil (B), Palm oil (C) or Hybrid Palm oil (D). (E) Venn diagram showing the intersections of differentially expressed genes. O, Olive oil group; P, Palm oil group; HP, Hybrid Palm oil group.

Using databases for functional analysis enrichment of DEG showed that most modulated genes were found to be related to cellular amino acid metabolism, FA metabolic processes, steroid and cholesterol metabolic processes and FA beta-oxidation pathway, among others, for O group (Figure 7A); cellular calcium ion homeostasis or acyl-CoA metabolic process, among others, for P group (Figure 7B); and protein localization, lipid metabolic process, FA metabolic process and FA acid beta-oxidation,

among others, for HP group (Figure 7C). Suggesting in overall, that lipid metabolism pathways are dysregulated in liver transcriptome in response to high fat diet.



Figure 7. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes. Panther GO biological processes of over-represented terms of liver transcriptome according to the lipid supplementation: (A): O, Olive oil group; (B): P, Palm oil group; (C): HP, Hybrid Palm oil group.

3. Discussion

Food industry has been extensively using lipid sources that could maintain texture and increase shelf life of foodstuff [24]. For many years, these products were primarily made up of partially hydrogenated fat rich in trans FA, in foods such as margarines, cookies and ice creams. Several studies have demonstrated that the use of trans-fat can trigger disturbances in health, such as obesity, cardiovascular diseases and other factors related to metabolic syndrome. Since then, the industry has been using other lipid sources for replacement of trans fat in foods [24,25]. P oil currently represents the most used vegetable oil by food industry, even though little is known about health risks related to them [18]. In this sense, the results of this study, comparing high-fat diets rich in P or HP oils with O oil, caused in mice distinct biomolecular effects and, therefore, signal to important deleterious effects caused by their excessive intake.

High-fat diets are known to increase body weight and adiposity in rodents [26], making this type of diet the main choice for the study of obesity in animal models. More recently, high-fat diets have been used to induce NAFLD in animals, in order to study both the pathophysiology and possible treatments for this disease [27,28]. Indeed, among the animal models of NAFLD, the "high-fat diet induced" model is referred as the one that mimics human NAFLD the most [28]. In our study, not all animals fed a diet rich in lipids gained weight. The body weight of the groups fed with O or HP oils were similar to the C group, whereas the P group showed a significant increase compared to all the others, suggesting that the type of fat influences how body weight is changed throughout lifespan. This is in accordance to other studies, reviewed by Hariri & Thibault [26]. Factors like saturation of the FA and size of the carbon chain directly influence the bioavailability of the FA consumed. Saturated FAs (SFAs), in instance, are poorly used for immediate energy upon intake and absorption, so they tend to be stored in adipose tissue. PUFA tend to be immediately oxidized or incorporated on another function. MUFA, otherwise, are controversial, with studies showing conflicting results [26].

Although many studies in humans [29,30] promote O oil (high in MUFA) as an oil with therapeutic use, there is no consensus about the amount needed for the benefits without any harm. Evidence shows an association between MUFA intake and waist-hip ratio in an obese Mediterranean population [31]. On that matter, our study indicated that

although the O group weight did not differ from C group, it had increased body fat compared to all groups, measured both directly and via CT. A physiological explanation for that may be inferred by the study of Benner et al. [32], where the authors showed that oleic acid is preferentially incorporated in triglycerides in rabbit hepatocytes, to be after exported to adipose tissue. This mechanism may also partially explain our results in mice regarding the lower percentage of fat found in the liver of O group (Table 1) accompanied by greater accumulation of adipose tissue, investigated by CT-scan.

In fact, the fat located in liver measured by the Bligh-Dyer method revealed that C and O groups did not differ, whilst P group showed increased liver fat and HP showed the highest liver fat amount. Liver histology analyses confirmed these data, when comparing to animals in C group, the O group showed small amounts of lipid vacuoles in tissue. Both P and HP groups exhibited signs of hepatocytes ballooning, yet only HP demonstrated significant inflammatory infiltration, neovascularization and nuclear vacuolization. According to the definition of NAFLD by the American Association for the Study of Liver Diseases [1], NAFLD can be classified in different stages: NAFL or NASH. NAFL (onset of disease) is defined as a simple accumulation of fat in liver tissue with absence of hepatocyte ballooning, while NASH (the most severe form of the disease) is characterized as a fat accumulation and inflammation in liver tissue with hepatocyte ballooning, with or without fibrosis - as we observed in P and HP groups. The NAS score also revealed that P and HP liver tissues resembles NASH, while O group presents a more NAFL pattern. The causal relationship of P and HP diets with the development of NASH, however, is a new evidence, for the best of our knowledge, not previously demonstrated. Thus, our study showed that high-fat P and HP diets act differently in liver tissue of mice, causing more hepatic dysfunction in P and HP than O and C groups. Whether these effects may be associated with changes in liver mitochondrial bioenergetics is currently being investigated in our laboratory, as different dietary lipid sources have been shown to impair liver mitochondrial bioenergetics in distinct ways [33].

In another study with Marmosets [24], we showed that both P and HP oils altered hepatic metabolism and caused lipid accumulation, with HP performing worst. We also demonstrated in another study that palmitic acid - the main SFA present in P and HP oils - is independently associated with liver fibrosis in patients with NAFLD [13]. In fact, the NOD-like receptor family pyrin containing 3 (NLRP3) inflammasome has been associated with the development of NASH and palmitic acid increases the expression of NLRP3 inflammation and induces IL-1b e TNF - a secretion in liver favoring the progression of NAFLD [34]. With these evidences, we can hypothesize that a high intake of palmitic acid through P or HP oils is somewhat involved in liver damage in mice, inducing NASH in just eight weeks of feeding. Regarding O oil, further studies are necessary to investigate whether mice fed for a longer time can predispose the development of NASH. The results of the present study demonstrated that the type of fat, in the context of a high-fat diet, can predispose mice to NAFLD, with difference in the phenotype of the disease according to the fat consumed. This is problematic, since NAFLD is a spectrum that, if not treated, can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. [1] High-fat diets have been shown to be both promoter and initiator of liver cancer in mice, when animals were fed long-term [35,36]

Since liver orchestrates the metabolism of several biochemical parameters [37], we looked into the effects of the high-fat diets on these aspects. Serum total and HDL cholesterol increased in all experimental groups, with the most prominent enhancement visualized in O and HP groups, while LDL cholesterol did not presented statistical difference between groups. O and HP are oils with higher content of oleic acid than P oil, a fatty acid for decades known to increase HDL [38]. Both VLDL and triglycerides were elevated only in HP group, with significant difference compared to the others. In addition, glucose was increased in all groups in relation to C group, yet HP caused the highest

elevation of all, with statistical difference between all groups. This scenario can be interpreted as insulin resistance in different stages, with the worst case being the HP group. As extensively reviewed by Sparks et al. [39], insulin resistance is responsible for VLDL overproduction and hypertriglyceridemia, since insulin is involved in all lipoproteins metabolism and secretion. According to the increase in glucose, VLDL and triglycerides, we can infer that HP oil caused insulin resistance in mice. To confirm this hypothesis, future works in this field will be necessary.

Other serum biomarkers were also differentially affected by the diets. AST/ALT ratio was higher in HP groups when compared exclusively with P group. This index reflects hepatic damage and can predict liver impairment, insulin resistance and incident metabolic syndrome [40,41,42]. Thus, mice from the HP group appear to face more liver disturbances than the other groups, in accordance to data in Marmoset with the same oil [24]. Alkaline phosphatase was also significantly increased in HP mice serum, while P and O mice were comparable to C mice. This enzyme is traditionally related to cholestatic injury [43], yet there is evidence of cases of NAFLD with high alkaline phosphatase [44]. Gamma-glutamyl transferase concentration, on the other hand, was not different between HP and C groups, but was lower in O and P groups compared to C group. Low levels of this enzyme in serum are not common in studies or in clinical practice. According to Ndrepepa & Kastrati (2016) [45], gamma-glutamyl transferase's most pivotal role is the cleavage of glutathione, liberating the three amino acids that form it (glutamic acid, cysteine and glycine) and making it possible for the cell to absorb these amino acids to synthetize glutathione again, or to utilize them in other metabolic pathway. Evidences associate high gamma-glutamyl transferase with cardiovascular diseases [45,46], however neither of them address the issue of low serum concentration of this enzyme. In the absence of accurate evidence comprising high-fat diets and glutathione to explain this decrease, we can only hypothesize that this effect we observed is somewhat related to glutathione availability. This elicits further investigation concerning liver gammaglutamyl transferase, glutathione metabolism and high-fat diets containing either P or O oils.

Previous studies have compared the consumption of palmitic acid vs oleic acid, both in rodents [47] and humans, under normal level of lipids. While similar effects on lipid level profiles were found in normocholesterolemic men and women, in rodents, certain differences were found in plasma lipids but not in liver tissue cholesterol levels [47]. Few studies have compared the effects of these fats under high-fat diet conditions. In a recent study, comparing O oil vs P stearin under high-fat diet, Meidan et al. [48] found that mice receiving either P or O fats showed an increased body weight, elevated blood glucose levels and fatty liver phenotype. In rats, high dietary intake of P oil was found to compromise glucose tolerance, while O compromised liver lipid metabolism and integrity [49]. In overall, the above-mentioned studies suggest regarding lipid metabolism, the response to dietary lipids might be exacerbated in the context of a high-fat diet. Moreover, physiological conditions (i.e. obesity) might also influence the response to dietary lipids [50].

To the best of our knowledge, our study is the first to compare the liver transcriptome of mice fed high-fat diets containing O, P and HP oils. Although we do not discard that response to dietary fats might be different in conditions of high-fat from that of normal diet, our data suggest that the total amount of fat might be a major driver of transcriptomic changes. Previous studies have evaluated the impact of a high-fat diet on the liver transcriptome [51] in rodents and in agreement with our data, most regulated genes were related to FA metabolism. Regarding inflammatory genes, in accordance with previous works [49], we did not observed major changes in classical inflammatory genes in liver including IL-6, IL-1 β , MCP1 or TNF α [48]. Interestingly, cpt1a, a major player in oxidation of FA [52] was downregulated in HP group, while Scd1 gene was up-regulated in both P and HP groups. In overall, our data suggest that different oils produce a large amount of changes in the liver transcriptome, particularly for O and HP oils. Which of these changes, at mRNA levels, are determinant for the biological effects observed in the whole organisms, needs further characterization.

Our results suggest that high-fat diets containing MUFA or SFA disturb fat distribution and lipid metabolism in distinct ways, contributing to NAFLD establishment. This indicates that total amount of fat consumed is the main driver of liver disease development, and the type of fat can distinctly influence the degree of NAFLD developed. The limitations of our study are that it was performed under a high-fat diet context to better resemble the western diet, however we cannot predict whether these oils would induce the same metabolic disarrangements if animals were fed a diet with normal fat content. In addition, to understand if these results can be translated to humans, further studies involving NAFLD patients and these oils must be performed. Since P oil is the most cultivated, commercialized, consumed and utilized oil in the world [18] and HP oil is promoted as a healthy alternative for it [22,23], our data suggest that attention must be given to the liver outcomes observed here in mice before boosting these oils as safe and healthy.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Twenty-four male mice (*Mus musculus*), C57BI/6J, at 8 weeks of age, were used in this study. They were raised and kept at Biotério de Roedores of Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil, and were housed in groups (3 animals per cage). The room was controlled, with 12-h light/12-h dark cycle, average temperature of 23° C ± 2 and humidity of $50\% \pm 5$. The animals had free access to food and water.

All procedures followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Ethics Committee for The Use of Animals in Research of Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (protocol number 049/17).

4.2. Experimental dietetic protocol

The animals were randomly assigned to one of the four groups, with 6 animals each: Control (C) group, fed with chow diet (Laboratory Rodent Diet, LabDiet®); or one of three high-fat diets (41% fat), differing in the lipid sources: Olive Oil (O) group, containing olive oil; Palm Oil (P) group, containing palm oil; or Hybrid Palm Oil (HP) group, containing hybrid palm oil. The high-fat diets were formulated by Prag Soluções (São Paulo, Brazil), following the recommendations of the American Institute of Nutrition for rodents. The formulation of the high-fat diets is described in Table 3. Palm oil and hybrid palm oil were provided by Agropalma (Pará, Brazil). Olive oil was purchased from a local market. All groups were fed for 8 weeks.

Ingredients	g/100g
Ground Corn	8,80
Wheat middlings	8,50
Rice bran	8,00
Sucrose	19,50
Dehulled soybean meal	5,00
Casein	7,00
Powder milk	7,00
Albumin	11,20
Chicken meal	2,90

Table 3. Experimental diets composition shown as g/100g.

Soybean oil	2,00
P, HP or O oils	14,30
Fiber	2,00
Vitamins and minerals mix	3,86
Butylhydroxytoluene	0,02
Kcal/100g	422,08
Protein	16 %
Carbohydrate	43 %
Lipid	41%

4.3. Body weight and Computed tomography

Body mass was measured at the initial day (T0), before the dietary approach, and all across the intervention time. Computed tomography (CT) scans were performed in order to assess adipose tissue and liver images. All animals underwent CT scans at T0 and at the final time (T1), after the diets. The images were taken in an Optima PET/CT560 equipment, located at the Nuclear Medicine Service of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho of Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil), and processed on the AW4.6 software. The settings for CT scans were supine position, abdomen window, levels (WL) of -173 HU to -109 HU (HU scale calculated specifically for the animals in this study), slices of 0,62mm, 140Kv and 320mAs. Segmentation of adipose tissue was performed by Image J.51u software, where a tomography slice of each animal was used to count the Hounsfield unit (HU)scale pixels corresponding to the fat tissue of the animals. ImageJ is a public domain software that is well used in automatic or manual image processing in studies related to adipose tissue segmentation [53-55].

4.4. Biological sample collection and liver histological analyzes

At T1, after 4 hours of fasting, all animals were anesthetized intraperitoneally with 300mg/kg of Ketamine hydrochloride and 30mg/kg of Xylazine hydrochloride and blood was collected by cardiac puncture. Subsequently, liver and adipose tissue samples were collected. The blood was centrifuged (4000×g, 4 °C, 10 min) in order to collect serum samples and sent under refrigeration to Laborlife Clinical Analysis (Rio de Janeiro, Brazil) for biochemical analysis, such as total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL), triglycerides, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase and glucose. For these analyses, colorimetric chemical kinetic assays were used with an automated clinical analyzer (Metrolab 2300). Liver and the adipose tissues were weighted. A liver sample was used for histologic analysis: 100 mg of liver tissue was collected to perform transcriptome analysis, so it was immersed in RNAlater® Stabilization Solution (ThermoFischer), according to manufacturer's instructions, for further analysis. Then, it was stored at -80° C, with the rest of the sample. Tissues (defrosted) were fixed in formalin, paraffin embedded, and sections were stained with hematoxylin and eosin. Hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the lesion pattern and whether there was any type of cellular immune response. The analyzes were made based on the score system of Kleiner et al. [56]. In summary, the histological slices were scanned using a slide scanner (Pannoramic MIDI - 3D Histech), where the entire liver tissue sample was evaluated. The results were analyzed by an external expert pathologist and were based on observation of the degree of steatosis, focal inflammation, diffuse inflammation and nuclear vacuolation. NAFLD activity score (NAS) was performed in order to clarify the stage of liver disease in the animals [56].

4.5. Liver fat assessment

To assess liver fat, 200 mg of liver samples were submitted to lipid extraction according to Bligh and Dyer (1959) [57] and was determined by the gravimetric method. Results are expressed as percentage of the sample.

4.6. Liver transcriptome

Total mRNA of the liver samples was extracted with a PrepEase® kit (Affymetrix), following manufacturer's instructions. mRNA integrity was assessed with a NanoDrop-1000® equipment (ThermoFisher) before microarray-based transcriptomic analyses. Gene expression analysis was performed using Affymetrix Clariom S Mouse Assay microarrays. R Bioconductor oligo package was used for data processing in conjunction with pd.clariom.s.mouse annotation package. After background correction and RMA normalization, expression data was obtained for a total of 29129 features and 19 samples. Samples within the same experimental group which correlated poorly were removed. Thus, one sample was removed from MC, MPH and MAO groups respectively. Then microarray probes were annotated with the corresponding gene symbol, and NA's gene symbols were removed from the expression matrix. Differential expression levels between experimental groups were assesed with R Bioconductor limma package. Genes with a FDR lower than 0.05 were considered as statistically significant. Gene Ontology (GO) analysis of biological process (BP) was performed using Panther Database (http://www.pantherdb.org/pathway/) and using GO slim annotation. Only overrepresented (or under-represented) GO annotations with a FDR < 0.05 were considered.

4.7. Statistical analysis

The software GraphPad Prism 7.0 was used for statistical analysis. ANOVA test, along with Newman-Keuls post-hoc test were performed, adopting a significance level of $p \le 0.05$. Results are expressed as means ± standard error of the mean.

5. Conclusions

The consumption of high-fat diets containing either Olive, Palm or Hybrid Palm oils during eight weeks can predispose mice to the development of NAFLD. Olive oil promoted low liver fat accumulation, but prompted lobular inflammation, with transcriptomic modulation of amino acid and fatty acid metabolism. Palm and Hybrid Palm oils, in other way, induced not only liver fat accumulation, but also hepatocyte ballooning and lobular inflammation, resembling Nonalcoholic Steatohepatitis pattern. Transcriptome alterations in Palm oil-fed group were related to calcium ion homeostasis, whereas in Hybrid Palm oil-fed group were related to protein localization. As demonstrated in the present study, high dietary intake of Palm and Hybrid Palm oils can rapidly induce NASH in mice. These results raise concern about the high content of these oils in the most consumed processed food products around the world.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) - E-26/111.725/2013 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 305329/2016-2. Coordenação de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) funded a postgraduate scholarship - Finance Code 001. Spanish "Agencia Estatal de Investigación", European FEDER Funds (AGL2016-78922-R) and Fundación Ramón Areces (CIVP18A3888) also funded.

Acknowledgments: The authors wish to thank CAPES for the scholarship awarded.

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

Abbreviations

NAFLD Nonalcoholic fatty liver disease NAFL Nonalcoholic fatty liver

NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
FA	Fatty acids
MUFA	Monounsaturated fatty acids
PPAR	Peroxisome proliferator–activated receptors
SREBP-1	Sterol-regulatory element binding protein 1
TLR	Toll-like receptors
Р	Palm
HP	Hybrid Palm
0	Olive
СТ	Computed tomography
NAS	Nonalcoholic fatty liver disease activity score
AST / ALT	Aspartate aminotransferase / Alanine aminotransferase
DEG	Differentially expressed genes
SFA	Saturated fatty acids
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin containing 3
ТО	Initial day
T1	Final time
HU	Hounsfield unit
HDL	High-density lipoprotein cholesterol
LDL	Low-density lipoprotein cholesterol
VLDL	Very low-density lipoprotein cholesterol
GO	Gene ontology
BP	Biological process

References

- Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. **2018**, 67(1), 328-357; DOI:10.1002/hep.29367
- Bertot, L.C.; Adams, L. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 2016, 17(5), 774; DOI:10.3390/ijms17050774
- 3. Lonardo, A.; Byrne, C.D.; Caldwell, S.H.; Cortez-Pinto, H.; Targher, G. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology.* **2016**, 64(4), 1388-1389. DOI:10.1002/hep.28584
- 4. Araújo, A.R.; Rosso, N.; Bedogni, G.; Tiribelli, C.; Bellentani, S. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease/Non-Alcoholic Steatohepatitis: What We Need in the Future. *Liver Int.* **2018**, *38*, 47-51. DOI: 10.1111/liv.13643
- 5. Caligiuri, A.; Gentilini, A.; Marra, F. Molecular Pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci.* **2016**, 17(9), 1575. DOI:
- Fan, J.G.; Cao, H.X. Role of Diet and Nutritional Management in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal Of Gastroenterology And Hepatology*. 2013, 28, 81-87. DOI:10.3390/ijms17091575
- 7. Nakamura, A.; Terauchi, Y. Lessons From Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD. *Int J Mol Sci.* **2013**, 14(11), 21240-21257. DOI:10.3390/ijms141121240
- 8. Yasutake, K.; Kohjima, M.; Kotoh, K.; Nakashima, M.; Nakamuta, M; Enjoji, M.. Dietary Habits and Behaviors Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *World J Gastroenterol.* **2014**, *20*(7), 1756. DOI:10.3748/wjg.v20.i7.1756
- Westerbacka, J.; Lammi, K.; HäKkinen, A.M.; Rissanen, A.; Salminen, I.; Aro, A.; Yki-JäRvinen, H. Dietary Fat Content Modifies Liver Fat in Overweight Nondiabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**, 90(5), 2804-2809. DOI:10.1210/jc.2004-1983

- 10. Van Herck, M.; Vonghia, L.; Francque, S. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter's guide. *Nutrients*. **2017**, 9(10), 1072. DOI: 10.3390/nu9101072
- 11. Kakimoto, P.A.; Kowaltowski, A.J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol.* **2016**, 8, 216-225. DOI: 10.1016/j.redox.2016.01.009
- Juárez-Hernández, E.; Chávez-Tapia, N.C.; Uribe, M.; Barbero-Becerra, V.J. Role of Bioactive Fatty Acids in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutr J.* 2015, *15*(1), 72. DOI:10.1186/s12937-016-0191-8
- Cansanção, K.; Monteiro, L.S.; Leite, N.C.; Dávalos, A.; Carmo, M.G.T.; Peres, W.A.F. Advanced Liver Fibrosis is Independently Associated with Palmitic Acid and Insulin Levels in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 2018, 10(11), 1586. DOI:10.3390/nu10111586
- 14. Nagao, K.; Yanagita, T. Bioactive Lipids in Metabolic Syndrome. *Prog Lipid Res.* **2008**, 47(2), 127-146. DOI:10.1016/j.plipres.2007.12.002
- 15. Georgiadi, A.; Kersten, S. Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Adv Nutr.* **2012**, 3(2), 127-134. DOI:10.3945/an.111.001602
- Kucera, O.; Cervinkova, Z. Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats. World J Gastroenterol. 2014, 20(26), 8364. DOI:10.3748/wjg.v20.i26.8364
- 17. Nam, Y.; Jmn, M.; Long, K. Composition and Thermal Analysis of Lard Stearin and Lard Olein. *J Oleo Sci.* **2011**, 60(7), 333-338. DOI: 10.5650/jos.60.333
- Mba, O.I.; Dumont, M.J.; Ngadi, M. Palm Oil: Processing, Characterization and Utilization in the Food Industry–A Review. *Food Biosci.* 2015, 10, 26-41. DOI:10.1016/j.fbio.2015.01.003
- Orsavova, J.; Misurcova, L.; Ambrozova, J.V.; Vicha, R.; Mlcek, J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int J Mol Sci.* 2015, 16(6), 12871-12890. DOI:10.3390/ijms160612871
- Mancini, A.; Imperlini, E.; Nigro, E.; Montagnese, C.; Daniele, A.; Orrù, S; Buono,
 P. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, **2015**, 20(9), 17339-17361. DOI:10.3390/molecules200917339
- EMBRAPA. BRS Manicoré: Híbrido Interespecífico Entre o Caiaué e o Dendezeiro Africano Recomendado Para Áreas de Incidência de Amarelecimento-Fatal. Available online: <u>https://www.embrapa.br/solos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/867099/brs-manicore-hibrido-interespecifico-entre-o-caiaue-e-odendezeiro-africano-recomendado-para-areas-de-incidencia-de-amarelecimentofatal (Accessed on 13 November 2018).
 </u>
- 22. Ojeda, M.; Borrero, M.; Sequeda, G.; Diez, O.; Castro, V.; García, Á.; Ruiz, Á.; Pacetti, D.; Frega, N.; Gagliardi, R.; Lucci, P. Hybrid Palm Oil (Elaeis Oleifera× Elaeis Guineensis) Supplementation Improves Plasma Antioxidant Capacity in Humans. *Eur J Lipid Sci Technol.* **2017**, 119(2), 1600070. DOI: 10.1002/ejlt.201600070
- 23. Lucci, P.; Borrero, M.; Ruiz, A.; Pacetti, D.; Frega, N.G.; Diez, O.; Ojeda, M.; Gagliardi, R.; Parra, L.; Angel, M. Palm Oil and Cardiovascular Disease: a Randomized Trial of the Effects of Hybrid Palm Oil Supplementation on Human Plasma Lipid Patterns. *Food Funct.* **2016**, 7(1), 347-354. DOI:10.1039/c5fo01083g
- Spreafico, F.; Sales, R.C.; Gil-Zamorano, J.; Medeiros, P. C.; Latasa, M.J.; Lima, M.R.; Souza, S.A.L.; Martin-Hernández, R.; Gómez-Coronado, D.; Iglesias-Gutierrez, E; Mantilla-Escalante, D.C.; Carmo, M.G.T.; Dávalos, A. Dietary Supplementation with Hybrid Palm Oil Alters Liver Function in the Common Marmoset. *Sci Rep.* 2018, 8(1), 2765. DOI:10.1038/s41598-018-21151-0
- 25. Monteiro, C.A.; Moubarac, J.C.; Cannon, G.; Ng, S.W.; Popkin, B. Ultra-Processed Products are Becoming Dominant in the Global Food System. *Obes Rev.* **2013**, 14, 21-28. DOI:10.1111/obr.12107

- 26. Hariri, N.; Thibault, L. High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models. *Nutr Res Rev.* **2010**, 23(2), 270-299. DOI:10.1017/S0954422410000168
- Kanuri, G.; Bergheim, I. In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Int J Mol Sci. 2013, 14(6), 11963-11980. DOI:10.3390/ijms140611963
- Lau, J.K.C.; Zhang, X.; Yu, J. Animal Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives and Recent Advances. *J Pathol.* 2017, 241(1), 36-44. DOI:10.1002/path.4829
- 29. Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Monounsaturated Fatty Acids, Olive Oil and Health Status: a Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Lipids Health Dis.* **2014**, 13(1), 154. DOI:10.1186/1476-511X-13-154
- Elias, S.; Wisam, S.; Luai, A.; Massad, B.; Nimer, A. Lipotoxicity in Obesity: Benefit of Olive Oil. *Adv Exp Med Biol.* 2017, 960, 607-617. DOI:10.1007/978-3-319-48382-5_26
- Garaulet, M.; Marin, C.; Pérez-Llamas, F.; Canteras, M.; Tebar, F.J.; Zamora, S. Adiposity and Dietary Intake in Cardiovascular Risk in an Obese Population from a Mediterranean Area. *J Physiol Biochem.* **2004**, 60(1), 39-49. DOI:10.1007/BF03168219
- Benner, K.G.; Sasaki, A.; Gowen, D.R.; Weaver, A.; Connor, W.E. The Differential Effect of Eicosapentaenoic Acid and Oleic Acid on Lipid Synthesis and VLDL Secretion in Rabbit Hepatocytes. *Lipids.* **1990**, *25*(9), 534-540. DOI: 10.1007/BF02537160
- De Velasco, P.C.; Chicaybam, G.; Ramos-Filho, D.M.; Dos Santos, R.M.; Mairink, C.; Sardinha, F.L.; El-Bacha, T.; Galina, A.; Do Carmo, M.G.T. Maternal Intake of Trans-Unsaturated or Interesterified Fatty Acids During Pregnancy and Lactation Modifies Mitochondrial Bioenergetics in the Liver of Adult Offspring in Mice. *Br J Nutr.* 2017, 118(1), 41-52. DOI:10.1017/S0007114517001817
- 34. Zhu, W.; Feng, P.P.; He, K.; Li, S.W.; Gong, J.P. Liraglutide Protects Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Via Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in a Mouse Model Induced by High-Fat Diet. *Biochem Biophys Res Commun.* **2018**, *505(*2), 523-529. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.09.134
- 35. Dowman, J.K.; Hopkins, L.J.; Reynolds, G.M.; Nikolaou, N.; Armstrong, M.J.; Shaw, J.C.; Houlihan, D.D.; Lalor, P.F.; Tomlinson, J.W.; Hübscher, S.G.; Newsome, P.N. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of a high-fat/fructose diet and sedentary lifestyle. *Am J Pathol.* **2014**, 184(5), 1550-1561. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.034
- Karin, M.; Dhar, D. Liver carcinogenesis: from naughty chemicals to soothing fat and the surprising role of NRF2. *Carcinogenesis*. **2016**, 37(6), 541-546. DOI: 10.1093/carcin/bgw060
- Zhang, H.; Temel, R.E.; Martel, C. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism: Early Career Committee Contribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014, 34(9), 1791-1794. DOI:10.1161/ATVBAHA.114.304267
- Katan, M.B.; Zock, P.L.; Mensink, R.P. Effects of Fats and Fatty Acids on Blood Lipids in Humans: An Overview. *Am J Clin Nutr.* **1994**, 60(6), 1017S-1022S. DOI:10.1093/ajcn/60.6.1017S
- Sparks, J.D.; Sparks, C.E.; Adeli, K. Selective Hepatic Insulin Resistance, VLDL Overproduction, and Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012, 32(9), 2104-2112. DOI:10.1161/ATVBAHA.111.241463
- 40. Giannini, E.; Botta, F.; Fasoli, A.; Ceppa, P.; Risso, D.; Lantieri, P.B.; Celle, G.; Testa, R. Progressive Liver Functional Impairment is Associated With an Increase in AST/ALT Ratio. *Dig Dis Sci.* **1999**, *44*(6), 1249-1253. DOI:10.1023/A:1026609231094

- Zhao, L.; Cheng, J.; Chen, Y.; Li, Q.; Han, B.; Chen, Y.; Xia, F.; Chen, C.; Lin, D.; Yu, X.; Wang, N. Serum Alanine Aminotransferase/Aspartate Aminotransferase Ratio Is One Of The Best Markers Of Insulin Resistance In The Chinese Population. *Nutr Metab* (London). 2017, 14(1), 64. DOI:10.1186/s12986-017-0219-x
- 42. Yadav, D.; Choi, E.; Ahn, S.V.; Baik, S.K.; Zoo Cho, Y.; Koh, S.B.; Huh, J.H.; Chang, Y.; Sung, K.C.; Kim, J.Y. Incremental Predictive Value of Serum AST-to-ALT Ratio for Incident Metabolic Syndrome: The ARIRANG Study. *PLoS One.* **2016**, 11(8), E0161304. DOI:10.1371/journal.pone.0161304
- Kwo, P.Y.; Cohen, S.M.; Lim, J.K. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *The Am J Gastroenterol.* **2017**, 112(1), 18. DOI:10.1038/ajg.2016.517
- 44. Pantsari, M.W.; Harrison, S.A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Presenting with an Isolated Elevated Alkaline Phosphatase. *J Clin Gastroenterol.* **2006**, 40(7), 633-635. DOI:10.1097/00004836-200608000-00015
- 45. Ndrepepa, G.; Kastrati, A. Gamma-Glutamyl Transferase and Cardiovascular Disease. *Ann Transl Med.* **2016**, 4(24). DOI:10.21037/atm.2016.12.27
- 46. Ndrepepa, G.; Colleran, R.; Kastrati, A. Gamma-Glutamyl Transferase and the Risk of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. *Clin Chim Acta*. **2017**, 476, 130-138. DOI:10.1016/j.cca.2017.11.026
- Kris-Etherton, P.M.; Ho, C.Y.; Fosmire, M.A. The Effect of Dietary Fat Saturation on Plasma and Hepatic Lipoproteins in the Rat. *J Nutr.* **1994**, 114(9), 1675-1682. DOI:10.1093/jn/114.9.1675
- 48. Meidan, E.; Kolesnikov, Y.; Tirosh, O. High Fat Diets Composed of Palm Stearin and Olive Oil Equally Exacerbate Liver Inflammatory Damage and Metabolic Stress in Mice. *Mol Nutr Food Res.* **2018**, 1700915. DOI:10.1002/mnfr.201700915
- Djohan, Y.F.; Badia, E.; Bonafos, B.; Fouret, G.; Lauret, C.; Dupuy, A.M.; Pinot, E.; Sutra, T.; Gaillet, S.; Lambert, K.; Raynaud, F. High Dietary Intake of Palm Oils Compromises Glucose Tolerance Whereas High Dietary Intake of Olive Oil Compromises Liver Lipid Metabolism and Integrity. *Eur J Nutr.* 2018, 1-17. DOI:10.1007/s00394-018-1854-3
- Lopes, L.L.; Rocha, D.M.U.; Silva, A.D.; Peluzio, M.D.C.G.; Bressan, J.; Hermsdorff, H.H.M. Postprandial Lipid Response to High-Saturated and High-Monounsaturated Fat Meals in Normal-Weight or Overweight Women. *J Am Coll Nutr.* 2018, 37(4), 308-315. DOI:10.1080/07315724.2017.1399835
- Roberts, M.D.; Mobley, C.B.; Toedebush, R.G.; Heese, A.J.; Zhu, C.; Krieger, A.E.; Cruthirds, C.L.; Lockwood, C.M.; Hofheins, J.C.; Wiedmeyer, C.E.; Leidy, H.J. Western Diet-Induced Hepatic Steatosis and Alterations in the Liver Transcriptome in Adult Brown-Norway Rats. *BMC Gastroenterol.* **2015**, 15(1), 151. DOI:10.1186/s12876-015-0382-3
- 52. Eaton, S.; Bartlett, K.; Quant, P.A. Carnitine Palmitoyl Transferase I and the Control of B-Oxidation in Heart Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**, *285*(2), 537-539. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5201
- 53. Pop, M.; Raluca, P. Using Abdominal CT Data for Visceral Fat Evaluation. *Acta Medica Marisiensis*. **2013**, 59(5), 254-256. DOI:10.2478/amma-2013-0058
- Irving, B.A.; Weltman, J.Y.; Brock, D.W.; Davis, C.K.; Gaesser, G.A.; Weltman, A. NIH Imagej And Slice-O-Matic Computed Tomography Imaging Software To Quantify Soft Tissue. *Obesity (Silver Spring)*. 2007, 15(2), 370-376. DOI:10.1038/oby.2007.573
- 55. Van Vugt, J.L.; Levolger, S.; Gharbharan, A.; Koek, M.; Niessen, W.J.; Burger, J.W.; Willemsen, S.P.; De Bruin, R.W.; Ijzermans, J.N. A Comparative Study of Software Programmes for Cross-Sectional Skeletal Muscle and Adipose Tissue Measurements on Abdominal Computed Tomography Scans of Rectal Cancer

Patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. **2017**, 8(2), 285-297. DOI:10.1002/jcsm.12158

- Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; Yeh, M. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2005, 41(6), 1313-1321. DOI:10.1002/hep.20701
- 57. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol.* **1959**, 37(8), 911-917. DOI:10.1139/o59-099

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. R. *et al.* Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, v.38, suppl. 1, p.47-51, 2018.

BABU, A. S. *et al.* Elastography in chronic liver disease: modalities, techniques, limitations, and future directions. **Radiographics**, v. 36, n. 7, p. 1987-2006, 2016.
BASARANOGLU, M. *et al.* Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. World Journal of Gastroenterology, v. 19, n. 8, p. 1166-1172, 2013.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BERNAS, A. *et al.* Kinetics of linoleic acid hydrogenation on Pd/C catalyst. **Applied Catalysis A: General**, v. 353, n. 2, p. 166-180, 2009.

BERNAS, A. *et al.* Continuous mode linoleic acid hydrogenation on Pd/sibunit catalyst. **Catalysis in Industry**, v. 2, n. 2, p. 95-100, 2010.

BERTOLA, A. Rodent models of fatty liver diseases. **Liver Research**, v. 2, n. 1, p. 3-13, 2018.

BISPO, K. P. *et al.* Trans and interesterified fat and palm oil during the pregnancy and lactation period inhibit the central anorexigenic action of insulin in adult male rat

offspring. The Journal of Physiological Sciences, v. 65, n. 1, p. 131-138, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and

purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOLSONI-LOPES, A.; ALONSO-VALE, M. I. C. Lipolysis and lipases in white adipose tissue–an update. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 4, p. 335-342, 2015.

BRASIL. Resolução Normativa CONCEA nº 13 de 20/09/2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA. 2013. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Guia Alimentar para a População

Brasileira. 2ª ed., 2014.

BUGIANESI, E. *et al.* Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 17, p. 1941-1951, 2010.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism – Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038-1048, 2016.

CHALASANI, N. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328-357, 2018.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Artmed, 2006.

CHEN, B. K. *et al.* Multi-Country analysis of palm oil consumption and cardiovascular disease mortality for countries at different stages of economic development: 1980-1997. **Globalization and Health**, v. 7, p. 45, 2011.

CORBIN, K. D.; ZEISEL, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. **Current Opinion in**

Gastroenterology, v. 28, n. 2, p. 159-165, 2012.

CUSI, K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic

steatohepatitis. Clinics in Liver Disease, v. 13, n. 4, p. 545-563, 2009.

DE VELASCO, P. C. *et al.* Maternal intake of trans-unsaturated or interesterified fatty acids during pregnancy and lactation modifies mitochondrial bioenergetics in the liver of adult offspring in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 118, n. 1, p. 41-52, 2017. DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.

DIAS, F. S. L. *et al.* Were policies in Brazil effective to reducing trans fat from industrial origin in foods? **Revista de Saúde Pública**, v. 52, n. 34, p. 1-9. 2018.

DINU, M. *et al.* Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 30-43, 2018.

DJOHAN, Y. F. *et al.* High dietary intake of palm oils compromises glucose tolerance whereas high dietary intake of olive oil compromises liver lipid metabolism and integrity. **European Journal of Nutrition**, p. 1-17, 2018.

EASL; EASD; EASO. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Obesity Facts**, v. 9, n. 2, p. 65-90, 2016.

EMBRAPA. *Palma de Óleo (Hibrido interespecífico Elaeis oleifera x E. guineensis) -BRS Manicoré*, 2010. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoestecnologicas/-/produto-servico/941/palma-de-oleo-hibrido-interespecifico-elaeisoleifera-x-e-guineensis---brs-manicore>. Acesso em 02 dez. 2020.

ERKEKOGLU, P. *et al.* Hepatocellular carcinoma and possible chemical and biological causes: a review. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 36, n. 2, p. 171-190, 2017.

FATTORE, E. *et al.* Palm oil and blood lipid–related markers of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of dietary intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1331-1350, 2014.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty

acids. World Journal of Gastroenterology, v. 20, n. 7, p. 1746-1755, 2014.

FOSCOLOU, A.; CRITSELIS, E.; PANAGIOTAKOS, D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. **Maturitas**, v. 118, p. 60-66, 2018.

FUCHS, B. *et al.* Lipid analysis by thin-layer chromatography—a review of the current state. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2754-2774, 2011.

GAINO, N. M. *et al.* Disponibilidade domiciliar de alimentos industrializados no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 26, n. 206/207, p. 55-63, 2012.

GESTEIRO, E.; GALERA-GORDO, J.; GONZÁLEZ-GROSS, M. Aceite de palma y salud cardiovascular: consideraciones para valorar la literatura. **Nutrición Hospitalaria**, v. 35, n. 5, p. 1229-1242, 2018.

GO, R. E. *et al.* Effects of palm and sunflower oils on serum cholesterol and fatty liver in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 3, p. 363-369, 2015.

GREEN, C. J. *et al.* Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. **Laboratory Animals**, v. 15, n. 2, p. 163-170, 1981.

HAYES, K. C.; PRONCZUK, A. Replacing trans fat: the argument for palm oil with a cautionary note on interesterification. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 29, suppl. 3, p. 253S-284S, 2010.

HYLOWN CONSULTING LLC. Power And Sample Size. Disponível em:

<http://powerandsamplesize.com>. Acesso em 1 out. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009:**Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil.** Rio de Janeiro, 2011.

IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. The nomenclature of lipids: Recommendations (1976). **Lipids**, v. 12, n. 6, p. 455-468, 1977.

JUÁREZ-HERNÁNDEZ, E. *et al.* Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Journal**, v. 15, p. 1-10, 2015.

JUMP, D. B. *et al.* Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2503-2506, 2005.

KADHUM, A. A. H.; SHAMMA, M. N. Edible lipids modification processes: A

review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 48-58, 2017. KLEINER, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1321, 2005.

KORBECKI, J.; BAJDAK-RUSINEK, K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. **Inflammation Research**, v. 68, p. 915-932, 2019.

KUCERA, O.; CERVINKOVA, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 26, p. 8364, 2014. KUHNT, K.; DEGEN, C.; JAHREIS, G. Evaluation of the impact of ruminant trans fatty acids on human health: important aspects to consider. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 12, p. 1964-1980, 2016.

KWOK, R. M.; TORRES, D. M.; HARRISON, S. A. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? **Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 1166-1174, 2013.

LAU, J. K. C.; ZHANG, X.; YU, J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. **The Journal of Pathology**, v. 241, p. 36-44, 2017.

LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 165-174, 2013.

LOPES, R.; DA CUNHA, R. N. V.; DE RESENDE, M. D. V. Produção de cachos e parâmetros genéticos de híbridos de caiaué com dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1496-1503, 2012.

LUCCI, P. *et al.* Palm oil and cardiovascular disease: a randomized trial of the effects of hybrid palm oil supplementation on human plasma lipid patterns. **Food & Function**, v. 7, p. 347-354, 2016.

MAGRI, T. P. R. *et al.* Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat in maternal diet can predispose obesity in adult male

offspring. Clinical Nutrition, v. 34, n. 5, p. 904-910, 2015.

MANCINI, A. *et al.* Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17339-17361, 2015.

MBA, O. I.; DUMONT, M.; NGADI, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry–A review. **Food Bioscience**, v. 10, p. 26-41, 2015.

MENDONÇA, R. D. *et al.* Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 1433-1440, 2016.

MICHA, R.; MOZZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on cardiometabolic health and implications for policy. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty**

Acids, v. 79, n. 3, p. 147-152, 2008.

MISAN, V. *et al.* Interesterified fat or palm oil as substitutes for partially hydrogenated fat during the perinatal period produces changes in the brain fatty acids profile and increases leukocyte–endothelial interactions in the cerebral microcirculation from the male offspring in adult life. **Brain Research**, v. 1616, p. 123-133, 2015.

MONTEIRO, C. A. Nutrition and health. The issue is not food, nor nutrients, so much as processing. **Public Health Nutrition**, v. 12, n. 5, p. 729-731, 2009.

MONTEIRO, C. A. *et al.* Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity Reviews**, v. 14, suppl. 2, p. 21-28, 2013.

NASCIMENTO, C. M.; RIBEIRO, E. B.; OYAMA, L. M. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 453-466, 2009.

NAKAMURA, A.; TERAUCHI, Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21240-21257, 2013.

NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 53, p. 124-144, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NESTEL, P.; NOAKES, M.; CLIFTON, P. Fats for the food industry: implications for cholesterol-lowering. **Lipids**, v. 31, n. 1, p. S65-S69, 1996.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. *et al.* Dietary trans-Fatty Acid Induced NASH is Normalized Following Loss of trans-Fatty Acids from Hepatic Lipid Pools. **Lipids**, v. 47, n. 10, p. 941-950, 2012.

NIELSON, J. R.; RUTTER, J. P. Lipid-mediated signals that regulate mitochondrial biology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 20, p. 7517-7521, 2018.

NORRIS, P. C. *et al.* Phospholipase A2 regulates eicosanoid class switching during inflammasome activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. 12746-12751, 2014.

NÚÑEZ, O. M.; CLEMENTE, G. R.; GARCÍA, C. M. Role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of chronic liver diseases. **Medicina Clinica**, v. 121, n. 19, p. 743-748, 2003.

OJEDA, M. *et al.* Hybrid palm oil (Elaeis oleiferax Elaeis guineensis) supplementation improves plasma antioxidant capacity in humans. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 2, p. 1600070, 2017.

ORNLA-IED, P.; SONWAI, S.; LERTTHIRASUNTORN, S. Trans-free margarine fat produced using enzymatic interesterification of rice bran oil and hard palm stearin. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 673-680, 2016.

PACANA, T. *et al.* Dysregulated hepatic methionine metabolism drives homocysteine elevation in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136822, 2015.

PARNELL, J. A. *et al.* The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. **Liver International**, v. 32, n. 5, p. 701-711, 2012.

PERES, F.; MARTINS, L. L.; FERREIRA-DIAS, S. Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3104-3126, 2017.

PERINI, J. A. L. *et al.* Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, p. 1075-1086, 2010.

PREISS-LANDL, K. *et al.* Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 5, p. 471-481, 2002.

RATNAYAKE, W. M. N.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 55, n. 1-3, p. 8-43, 2009.

REEVES, P. G. *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REICHARDT, C.; WELTON, T. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. 4^a ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde

cardiovascular. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 100, p. 1-40, 2013.

SCHNABEL, L. *et al.* Association between ultraprocessed food consumption and risk of mortality among middle-aged adults in France. **JAMA Internal Medicine**, v. 2019179, n. 4, p. 490-498, 2019.

SCORLETTI, E.; BYRNE, C. D. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 231-248, 2013. SHARIFNIA, T. *et al.* Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 4, p. G270-G278, 2015.

SOARES, J. B. *et al.* The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. **Hepatology International**, v. 4, n. 4, p. 659-672, 2010. SOOKOIAN, S. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is associated with a state of betaine-insufficiency. **Liver International**, v. 37, n. 4, p. 611-619, 2017.

SOTO-ALARCÓN, S. A. *et al.* Liver protective effects of extra virgin olive oil: Interaction between its chemical composition and the cell-signaling pathways involved in

protection. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets, v. 18, n. 1, p. 75-84, 2018.

SPREAFICO, F. *et al.* Dietary supplementation with hybrid palm oil alters liver function in the common Marmoset. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2765, 2018.

SROUR, B. *et al.* Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: prospective cohort study (NutriNet-Santé). **British Medical Journal**, v. 365, p. I1451, 2019.

STEFELY, J. A.; PAGLIARINI, D. J. Biochemistry of mitochondrial coenzyme Q biosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 10, p. 824-843, 2017. STENDER, S. *et al.* Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred

by multiple loci. Nature Genetics, v. 49, n. 6, p. 842-847, 2017.

SUNSHINE, H.; IRUELA-ARISPE, M. L. Membrane lipids and cell signaling. **Current Opinion in Lipidology**, v. 28, n. 5, p. 408-413, 2017.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 19, p. 2300-2308, 2012.

TEIXEIRA, W. G. *et al.* A hipótese abiótica como agente causal do amarelecimento fatal (AF) da palma de óleo (*Elaeis guineensis Jacq.*) no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 36., 2017, Belém. *Anais...* Belém: EMBRAPA, 2017.

TONETTO, G. M. *et al.* Partial hydrogenation of sunflower oil: use of edible modifiers of the cis/trans-selectivity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 299, n. 1-2, p. 88-92, 2009.

TROVATO, F. M. *et al.* Early effects of high-fat diet, extra-virgin olive oil and vitamin D in a sedentary rat model of non-alcoholic fatty liver disease. **Histology and Histopathology**, v. 33, n. 11, p. 1201-1213, 2018.

TROVATO, F. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevention: role of Mediterranean diet and physical activity. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 167-169, 2019.

TSAI, E.; LEE, T. P. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis, including noninvasive biomarkers and transient elastography. **Clinics in Liver Disease**, v. 22, n. 1, p. 73-92, 2018.

TVRZICKA, E. *et al.* Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease-a review. Part 1: classification, dietary sources and biological
functions. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc**, v. 155, n. 2, p. 117-130, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Agricultural Research Service* – *USDA Food Composition Databases.* Disponível em <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>. Acesso em 15 nov. 2020.

VAN HERCK, M.; VONGHIA, L.; FRANCQUE, S. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter's guide. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. E1072, 2017.

WANG, Y.; HEKIMI, S. Understanding ubiquinone. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 5, p. 367-378, 2016.

WILLIAMS, A. LB; HOOFNAGLE, J. H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis relationship to cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 734-739, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *REPLACE Trans Fat – an action package to eliminate industrially-produced trans-fatty acids*, 2018. Disponível em https://www.who.int/docs/default-source/documents/replace-transfats/replace-action-package.pdf>. Acesso em 03 dez. 2020.

YASUTAKE, K. *et al.* Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1756-1767, 2014. YKI-JÄRVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 2, n. 11, p. 901-910, 2014. ANEXOS

ANEXO A. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA CEUA/UFRJ



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 10 de julho de 2017

Prezada Professora Maria das Graças Tavares do Carmo

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: "Influência de diferentes fontes lipídicas sobre a adipogênese e a morfologia do tecido adiposo: um estudo de composição corporal em camundongos.", protocolo nº 049/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 27/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 10/07/2018
Espécie/linhagem	Mus muscullus/ C57BL6
N° de animais	48 animais
Peso/idade	24g / 3 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Anilab - Animais de Laboratório Criação
	e Comércio - São Domingos - Paulina
	SP CNLJ: 65.440.612/0001-40

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.uftj.br

ANEXO B. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES



Article

Olive Oil, Palm Oil, and Hybrid Palm Oil Distinctly Modulate Liver Transcriptome and Induce NAFLD in Mice Fed a High-Fat Diet

Rafael C. Sales ^{1,*,†}, Priscylla C. Medeiros ^{2,†}, Flavia Spreafico ^{1,3}, Patrícia C. de Velasco ¹, Fernanda K. A. Gonçalves ¹, Roberto Martín-Hernández ⁴, Diana C. Mantilla-Escalante ³, Judit Gil-Zamorano ³, Wilza A. F. Peres ¹, Sergio A. L. de Souza ², Alberto Dávalos ³ and Maria G. Tavares do Carmo ^{1,*}

- ¹ Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; flaviasfer@gmail.com (F.S.); patriciac.velasco@gmail.com (P.C.d.V.); fernandakgst@gmail.com (F.K.A.G.); wilza@nutricao.ufrj.br (W.A.F.P.)
- ² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21044-020, Brazil; pri.biomed3@gmail.com (P.C.M.); sergioalsouza@gmail.com (S.A.L.d.S.)
- ³ Laboratory of Epigenetics of Lipid Metabolism, Madrid Institute for Advanced Studies (IMDEA)-Food, CEI UAM+CSIC, 28049 Madrid, Spain; diana.mantilla@imdea.org (D.C.M.-E.); judit.gil@imdea.org (J.G.-Z.); alberto.davalos@imdea.org (A.D.)
- ⁴ GENYAL Platform on Nutrition and Health, Madrid Institute for Advanced Studies (IMDEA)-Food, CEI UAM+CSIC, 28049 Madrid, Spain; roberto.martin@imdea.org
- * Correspondence: c.sales.rafael@gmail.com (R.C.S.); tcarmo@editema.com.br (M.G.T.d.C.); Tel.: +55-2139386596 (R.C.S.)
- + These authors contributed equally to this work.

Received: 2 December 2018; Accepted: 17 December 2018; Published: 20 December 2018



Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is highly prevalent worldwide. The most severe form is nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Among risk factors for the development of NAFLD is excessive lipid intake. Since palm (P) oil is the most consumed oil in the world, we aimed to investigate the effects of high-fat diets made with P oil, hybrid palm (HP) oil, or olive (O) oil in liver. Twenty-four male mice (C57Bl/6J) were fed a high-fat diet (41% fat) containing P, HP, or O oils for 8 weeks and compared to a control (C) group fed a chow diet. Adiposity was measured with computed tomography. Body, adipose tissue, and liver weights, as well as liver fat (Bligh–Dyer), blood lipid profile, glucose, and liver enzymes were measured. Liver histology (hematoxylin-eosin) and transcriptome (microarray-based) were performed. ANOVA tests with Newman-Keuls were used. Body weight was increased in the P group (p < 0.001) and body fat in the O group (C vs. O $p \le 0.01$, P vs. O $p \le 0.05$, HP vs. O $p \le 0.05$). All high-fat diets disturbed the blood lipid profile and glucose, with marked effects of HP on very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL), triglycerides, and alkaline phosphatase ($p \le 0.001$). HP had the highest liver fat (42.76 \pm 1.58), followed by P (33.94 \pm 1.13). O had a fat amount comparable to C (16.46 \pm 0.34, 14.71 \pm 0.70, respectively). P and HP oils induced hepatocyte ballooning. Transcriptome alterations of the O group were related to amino acid metabolism and fatty acid (FA) metabolism, the P group to calcium ion homeostasis, and HP oil to protein localization. Both P and HP oils induced NASH in mice via disturbed hepatocyte transcription. This raises concerns about the content of these oils in several industrialized foods.

Keywords: NAFLD; NASH; olive oil; palm oil; hybrid palm oil; high-fat diet; transcriptomics



1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a broad-spectrum disease, which encompasses liver steatosis (nonalcoholic fatty liver—NAFL) to inflammation, often with fibrosis (nonalcoholic steatohepatitis—NASH). NASH has been identified as an important risk factor for the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. This disease is highly associated with lifestyle, with both obesity and metabolic syndrome playing a central role in the ascending prevalence observed nowadays [2,3]. According to recent data, NAFLD is estimated to affect 25% of adult people worldwide [4]. Although this evidence raises concern about the impact of NAFLD in the world, the data available at the moment cannot explain some of the molecular mechanisms involved in the progress of this disease [5]. Therefore, efforts must be made to elucidate the gaps in the knowledge.

Among the known risk factors for the development of NAFLD, inadequate dietary habits are recognized as pivotal [6]. Excessive lipid intake, specifically, seems to be associated with accumulation of fat in animal liver [7], and also in epidemiologic [8] and human intervention [9] studies. Regarding mice, the use of a high-fat diet is the preferable model, since the phenotype of NAFLD developed by this model resembles human NAFLD most accurately. [7,10] As extensively reviewed by Kakimoto & Kowaltowski (2016) [11], high-fat diets can induce accumulation of fat in the liver (steatosis), even with no change in body weight. Several studies reported that insulin signaling impairment and excess production of reactive oxygen species are the main molecular mechanisms involved in accumulation of fat in liver tissue [7,10,11]. The type of fat is mainly important, as in vitro evidence shows that different kinds of fatty acids (FA) exert distinct effects on hepatocytes [12]. In a recent study, we have shown that subjects with advanced liver fibrosis had higher levels of saturated palmitic and stearic fatty acids, as well as oleic acid and total monounsaturated fatty acids (MUFA) in erythrocytes [13]. In fact, FAs are, today, described not only as energy sources, but also as important signaling mediators in several metabolic pathways [14]. In hepatocytes, FAs modulate gene expression through the activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), sterol-regulatory element binding protein 1 (SREBP-1), and toll-like receptors (TLR), among others [15]. In vivo and human studies regarding the effect of fats and oils in the development of NAFLD, however, are scarce. Most studies in animal models focus on the outcomes of lard diet consumption [16], an animal source of saturated fatty acids [17], albeit the most consumed lipid in the world in recent years is palm (P) oil [18].

P oil is extracted from the mesocarp of the fruit derived from the palm tree, *Elaeis guineensis*. The oil is rich in saturated fatty acids, especially palmitic acid—unlike most of the vegetable oils, which are rich in unsaturated fatty acids [19]. For this reason, P oil is semisolid at room temperature, making it suitable for the formulation of ultra-processed food, such as ice cream, cakes, and shortenings [20]. In order to improve the resistance to plagues and the production per hectare, researchers crossbred *Elaeis guineensis* with *Elaeis oleifera*, a variation of the palm tree, developing a new type of palm capable of generating an oil with the same characteristics of P oil, but with superior yield: the hybrid palm (HP) oil [21].

Some authors suggested that, because of the positive effects of HP oil supplementation in blood lipids and antioxidant capacity in humans, and also due to its higher content of oleic acid (a MUFA) and decreased content of palmitic acid, compared to P oil, it should be called "the tropical equivalent of olive oil" [22,23]. Evidence to support this is scarce, however. Concerning the liver, recent data have shown that marmosets fed a high-fat diet containing P or HP oils developed NAFLD, and animals fed a HP diet demonstrated an even higher level of damage to the liver when compared to the group that consumed P [24].

In this scenario, it is critical to investigate the effects of P and HP oils as possible triggers to the development of NAFLD, since the consumption of ultra-processed foods—rich in both oils—is increasing worldwide [25]. It is vital, also, to compare the effects of HP with olive (O) oil. The aim of the present study is to investigate the effects of high-fat diets containing P, HP, and O oils in the liver and the genetic modulation that these oils perpetrate as a mechanism to develop NAFLD.

2. Results

2.1. Body Weight and Adipose Tissue

To assess the dietary impact on body composition, body weight and body fat were measured after 8 weeks of feeding. The P group showed increased body weight compared to the control group (C), HP, and O ($p \le 0.001$), as shown in Figure 1A. However, when body fat was assessed, surprisingly the O group demonstrated higher fat content in relation to the three groups (C vs. O $p \le 0.01$, P vs. O $p \le 0.05$, HP vs. O $p \le 0.05$), as shown in Figure 1B. After an adjustment in the analyses, separating adipose tissue compartments, the O group showed substantially more subcutaneous fat than all others (C vs. O $p \le 0.01$, P vs. O $p \le 0.05$, HP vs. O $p \le 0.05$, as shown in Figure 1B. After an adjustment in the analyses, separating adipose tissue compartments, the O group showed substantially more subcutaneous fat than all others (C vs. O $p \le 0.01$, P vs. O $p \le 0.05$, HP vs. O $p \le 0.05$, as shown in Figure 1C, as well as increased visceral fat compared to the C group ($p \le 0.05$), as shown in Figure 1D.



Figure 1. Impact of experimental diets on animals' body weight (**A**), body fat (**B**), subcutaneous adipose tissue (**C**), and visceral adipose tissue (**D**). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$. C = control group; O = olive oil group; P = palm oil group; HP = hybrid palm oil group.

2.2. Adiposity Measurement by Computed Tomography (CT) in Mice

To further investigate adipose tissue deposits from baseline to completion of the 8-week study, we applied a CT scan and ImageJ 1.51u software to segment adipose tissue in the tomographic images, which made it possible to follow up groups throughout the study. The O oil group showed greater accumulation of adipose tissue after two months of diet, as shown in Figure 2D, followed by the P group, as shown in Figure 2F, and the HP group, as shown in Figure 2H. The C group showed no significant gain of body fat in two months, as shown in Figure 2B.



Figure 2. Axial tomographic slices between L4/L5 per dietary group, window levels (WL) -173 HU (Hounsfield units) to -109 HU. Segmentation of body fat (region in red) by ImageJ on the scale referring to adipose tissue of the animals. (**A**) control group (initial moment); (**B**) control group (2 months of diet); (**C**) olive oil group (initial moment); (**D**) olive oil group (2 months of diet); (**E**) palm oil group (initial moment); (**H**) hybrid palm oil group (2 months of diet).

2.3. Biochemical and Liver Analyses

Regarding serum metabolic parameters, the three high-fat diets increased total cholesterol compared to the C group, with both the O and HP groups demonstrating the highest values (C vs. O $p \le 0.01$, C vs. P $p \le 0.05$, C vs. HP $p \le 0.01$), as shown in Figure 3A. This increase in total cholesterol may be explained by the rise in serum high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (C vs. O $p \le 0.001$, C vs. P $p \le 0.01$, C vs. HP $p \le 0.001$), as shown in Figure 3B, promoted by all high-fat diets, whilst no change was observed in serum low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations, as shown in Figure 3C. Very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol, on the other hand, behaved differently, with higher concentrations being observed only in the HP group compared to others ($p \le 0.001$), as shown in Figure 3D, as well as triglyceride concentration ($p \le 0.001$), as shown in Figure 3E. Nevertheless, glucose levels were markedly affected by diets. Comparing to the control, all high-fat diets promoted an increase in serum glucose concentration, with the O and P groups behaving similarly (C vs. O $p \le 0.01$, C vs. P $p \le 0.01$, O vs. HP $p \le 0.02$, P vs. HP $p \le 0.05$), as shown in Figure 3F, suggesting a possible correlation between higher VLDL, triglycerides, and glucose in the HP group.



Figure 3. Changes in serum parameters according to each diet. Total cholesterol (**A**); high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (**B**); low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (**C**); very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol (**D**); triglycerides (**E**); glucose (**F**). Data expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$. C = control group; O = olive oil group; P = palm oil group; HP = hybrid palm oil group.

Serum liver biomarkers, shown in Figure 4, revealed that the HP diet promoted an increase in the aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase ratio (AST/ALT) in relation to the P diet (P vs. HP $p \le 0.05$), as shown in Figure 4A. Concerning alkaline phosphatase, a remarkable increase was observed when we compared HP to the other groups ($p \le 0.001$), as shown in Figure 4B. Gamma-glutamyl transferase, however, did not differ between HP and the other groups, with the O and P groups exhibiting lower concentrations in relation to the control (C vs. O $p \le 0.01$, C vs. P $p \le 0.01$), as shown in Figure 4C. We also measured total liver weight and performed a comparison of liver weight/body weight ratio between groups, in order to investigate whether diets promote proportionally an increase in this indicator. The results evidenced that P and HP diets significantly increased this ratio when compared to both the C and O groups ($p \le 0.001$), as shown in Figure 4D, whereas the O group unexpectedly showed a lower ratio compared to the C group ($p \le 0.001$), as shown in Figure 4D, suggesting that the O diet did not promote an increase in liver size and weight.





Figure 4. Effects of each diet on liver dynamics. (**A**), AST/ALT ratio; (**B**), alkaline phosphatase; (**C**), gamma-glutamyl transferase; (**D**), Liver weight/body weight ratio. Data presented as mean \pm standard error of the mean (n = 6). * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$. AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; C = control group; O = olive oil group; P = palm oil group; HP = hybrid palm oil group.

Based on these data, we also investigated whether these changes in serum biomarkers and liver weight were due to accumulation of fat in liver tissue. For this reason, we performed a Bligh–Dyer assay to quantify fat concentration in liver tissue of all animals, as shown in Table 1. The analyses revealed that the P and HP groups had substantially higher levels of liver fat (33.94 ± 1.13 and 42.76 ± 1.58 , respectively), with great statistical difference among groups ($p \le 0.0001$). The higher levels of liver fat in the HP group could be indicative that this diet-induced fat accumulation in the liver potentially caused liver damage, thus resulting in elevation of liver enzymes, as demonstrated in Figure 4.

Group	Liver Fat (%)	Statistical Significance Versus Control	Statistical Significance Versus Olive oil	Statistical Significance Versus Palm Oil	Statistical Significance Versus Hybrid Palm Oil
Control	14.71 ± 0.70	-	p = 0.1189	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001
Olive oil	16.46 ± 0.34	p = 0.1189	-	p < 0.0001	p < 0.0001
Palm oil	33.94 ± 1.13	<i>p</i> < 0.0001	p < 0.0001	-	<i>p</i> < 0.0001
Hybrid Palm oil	42.76 ± 1.58	<i>p</i> < 0.0001	<i>p</i> < 0.0001	p < 0.0001	-

Table 1. Liver fat measurements in mice submitted to a high-fat diet protocol (%).

Measured by the Bligh–Dyer method; data presented as means \pm standard error of the mean (n = 6).

2.4. Histological Analysis

The P, HP, and O groups showed higher amounts of lipid vacuoles. Quantification of inflammatory infiltrate, neovascularization, and nuclear vacuolization was observed in greater amounts in the HP group, as shown in Figure 5. In addition, the P and HP groups showed a possible hydropic degeneration (ballooning), characterized by the accumulation of water in the intracellular environment due to the loss of the cell's ability to maintain ionic balance and fluid homeostasis. NAFLD activity score (NAS) was performed in all groups, as shown in Table 2, and revealed that the O group histology resembles non-NASH NAFLD (score 3), whereas the P and HP groups showed a NASH pattern (score 5 for both).



Figure 5. Histological analyses with a hematoxylin-eosin stain of the liver revealed damage induced by high-fat diets, according to the lipid offered: (**A**), control group; (**B**), olive oil group; (**C**), palm oil group; (**D**), hybrid palm oil group. Arrow: lipid vacuoles; Arrowhead: inflammatory infiltrate; Asterisk: nuclear vacuolization; Hash symbol: hydropic degeneration.

Group	Grade of Steatosis	Lobular Inflammation	Ballooning	NAFLD Activity Score
Control	1	0	0	1
Olive oil	1	2	0	3
Palm oil	2	2	1	5
Hybrid Palm oil	2	2	1	5

Table 2. NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) activity score (NAS) based on histological analyses.

2.5. Transcriptomic Analyses

To determine whether the above-mentioned changes in biochemical parameters modify liver gene expression, we next analyzed the transcriptome of liver mice consuming different types of diets. The whole transcriptome was performed using microarrays gene expression, as shown in Figure 6. Cluster analysis showed that diets containing high-fat differed from the control, as shown in Figure 6A, while the P and HP groups were more similar in gene expression than the O group. Mice consuming O showed a large amount (2479) of differentially expressed genes (DEG), from which 1781 were up-regulated and 698 down-regulated. By contrast, the P group showed the lowest amount of liver transcript changes (168), from which 62 were up-regulated and 106 down-regulated. We also found that the HP group had the highest number (2529) of DEG, of which 1817 up-regulated and 712 were down-regulated. Some of the DEG were common in two or three groups, as shown in Figure 6E. Common transcripts between the O and P groups include adgrb3, nrp2, olfr1222, cspr2, slx11, dppa2, spin2d, vmn1r114, vmn1r158, and vpreb1, among others. Common transcripts between the P and HP groups include acot9, mrp132, baiap2, casq2, rpp25, dis312, fastkd1, foxo1, irgm1, and lsm1. Common genes among the O and P groups include more than 1300 genes.



Figure 6. Liver gene expression analysis. (**A**) Heatmap of microarrays data of different dietary groups. Scatter plots in mice liver receiving either olive oil (**B**), palm oil (**C**), or hybrid palm oil (**D**). (**E**) Venn diagram showing the intersections of differentially expressed genes. O, olive oil group; P, palm oil group; HP, hybrid palm oil group.

Using databases for functional analysis enrichment of DEG showed that most modulated genes were found to be related to cellular amino acid metabolism, FA metabolic processes, steroid and cholesterol metabolic processes, and the FA beta-oxidation pathway, among others, for the O group, as shown in Figure 7A; cellular calcium ion homeostasis or acyl-CoA metabolic processes, among others, for the P group, as shown in Figure 7B; and protein localization, lipid metabolic processes, FA metabolic processes, and FA acid beta-oxidation, among others, for the HP group, as shown in Figure 7C. Suggesting overall that lipid metabolism pathways are dysregulated in liver transcriptome in response to a high-fat diet.





Figure 7. Functional enrichment analysis of differentially expressed genes. Panther Gene Ontology (GO) biological processes (BP) of over-represented terms of liver transcriptome according to the lipid supplementation: (**A**): O, olive oil group; (**B**): P, palm oil group; (**C**): HP, hybrid palm oil group.

3. Discussion

The food industry has been extensively using lipid sources that could maintain the texture and increase the shelf life of foodstuffs [24]. For many years, these products were primarily made up of partially hydrogenated fats rich in trans FA, in foods such as margarines, cookies, and ice creams. Several studies have demonstrated that the use of trans fat can trigger disturbances in health, such as obesity, cardiovascular diseases, and other factors related to metabolic syndrome. Since then, the industry has been using other lipid sources for the replacement of trans fats in foods [24,25]. P oil currently represents the most used vegetable oil by the food industry, even though little is known about the health risks related to it [18]. In this sense, the results of this study, comparing high-fat diets rich in P or HP oils with O oil, caused in mice distinct biomolecular effects and, therefore, signal important deleterious effects caused by their excessive intake.

High-fat diets are known to increase body weight and adiposity in rodents [26], making this type of diet the main choice for the study of obesity in animal models. More recently, high-fat diets have been used to induce NAFLD in animals, in order to study both the pathophysiology and possible treatments for this disease [27,28]. Indeed, among the animal models of NAFLD, the "high-fat diet induced" model is referred to as the one that mimics human NAFLD the most [28]. In our study, not all animals fed a diet rich in lipids gained weight. The body weight of the groups fed with O or HP oils were similar to the C group, whereas the P group showed a significant increase compared to all the others, suggesting that the type of fat influences how body weight is changed throughout the lifespan. This is in accordance with other studies, reviewed by Hariri & Thibault [26]. Factors like saturation of the FA and size of the carbon chain directly influence the bioavailability of the FA consumed. Saturated FAs (SFAs), for instance, are poorly used for immediate energy upon intake and absorption, so they tend to be stored in adipose tissue. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) tend to be immediately oxidized or incorporated on another function. MUFA, otherwise, are controversial, with studies showing conflicting results [26].

Although many studies in humans [29,30] promote O oil (high in MUFA) as an oil with therapeutic use, there is no consensus about the amount needed for the benefits without any harm. Evidence shows an association between MUFA intake and waist-hip ratio in an obese Mediterranean population [31]. On that matter, our study indicated that although the O group weight did not differ from C group, it had increased body fat compared to all groups, measured both directly and via CT. A physiological explanation for that may be inferred from the study of Benner et al. [32], where the authors showed that oleic acid is preferentially incorporated in triglycerides in rabbit hepatocytes, to be exported after to adipose tissue. This mechanism may also partially explain our results in mice regarding the lower percentage of fat found in the liver of the O group, as shown in Table 1, accompanied by greater accumulation of adipose tissue, investigated by CT scan.

In fact, the fat located in the liver measured by the Bligh–Dyer method revealed that the C and O groups did not differ, whilst the P group showed increased liver fat and HP showed the highest liver fat amount. Liver histology analyses confirmed these data, when compared to animals in the C group, the O group showed small amounts of lipid vacuoles in tissue. Both the P and HP groups exhibited signs of hepatocytes ballooning, yet only HP demonstrated significant inflammatory infiltration, neovascularization, and nuclear vacuolization. According to the definition of NAFLD by the American Association for the Study of Liver Diseases [1], NAFLD can be classified in different stages: NAFL or NASH. NAFL (onset of disease) is defined as a simple accumulation of fat in liver tissue with absence of hepatocyte ballooning, while NASH (the most severe form of the disease) is characterized as fat accumulation and inflammation in liver tissue with hepatocyte ballooning, with or without fibrosis—as we observed in the P and HP groups. The NAS score also revealed that the P and HP liver tissues resembled NASH, while the O group presented a more NAFL pattern. The causal relationship of the P and HP diets with the development of NASH, however, is new evidence, and to the best of our knowledge, not previously demonstrated. Thus, our study showed that high-fat P and HP diets act differently in the liver tissue of mice, causing more hepatic dysfunction in the P and HP groups than the O and C groups. Whether these effects may be associated with changes in liver mitochondrial bioenergetics is currently being investigated in our laboratory, as different dietary lipid sources have been shown to impair liver mitochondrial bioenergetics in distinct ways [33].

In another study with marmosets [24], we showed that both P and HP oils altered hepatic metabolism and caused lipid accumulation, with HP performing worst. We also demonstrated in another study that palmitic acid—the main SFA present in P and HP oils—is independently associated with liver fibrosis in patients with NAFLD [13]. In fact, the NOD-like receptor family pyrin containing 3 (NLRP3) inflammasome has been associated with the development of NASH and palmitic acid increases the expression of NLRP3 inflammation and induces IL-1b e TNF—a secretion in liver favoring the progression of NAFLD [34]. With this evidence, we can hypothesize that a high intake of palmitic acid through P or HP oils is somewhat involved in liver damage in mice, inducing NASH in just eight weeks of feeding. Regarding O oil, further studies are necessary to investigate whether mice fed for a longer time can predispose the development of NASH. The results of the present study demonstrated that the type of fat, in the context of a high-fat diet, can predispose mice to NAFLD, with a difference in the phenotype of the disease according to the fat consumed. This is problematic, since NAFLD is a spectrum that, if not treated, can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. High-fat diets have been shown to be both the promoter and initiator of liver cancer in mice, when animals were fed long-term [35,36].

Since liver orchestrates the metabolism of several biochemical parameters [37], we looked into the effects of the high-fat diets on these aspects. Serum total and HDL cholesterol increased in all experimental groups, with the most prominent enhancement visualized in the O and HP groups, while LDL cholesterol did not present statistical difference between groups. O and HP are oils with a higher content of oleic acid than P oil, a fatty acid for decades known to increase HDL [38]. Both VLDL and triglycerides were elevated only in the HP group, with significant difference compared to the others. In addition, glucose was increased in all groups in relation to the C group, yet HP caused the highest elevation of all, with statistical difference between all groups. This scenario can be interpreted as insulin resistance in different stages, with the worst case being the HP group. As extensively reviewed by Sparks et al. [39], insulin resistance is responsible for VLDL overproduction and hypertriglyceridemia, since insulin is involved in all lipoprotein metabolism and secretion. According to the increase in glucose, VLDL, and triglycerides, we can infer that HP oil caused insulin resistance in mice. To confirm this hypothesis, future works in this field will be necessary.

Other serum biomarkers were also differentially affected by the diets. The AST/ALT ratio was higher in HP groups when compared exclusively with the P group. This index reflects hepatic damage and can predict liver impairment, insulin resistance, and incident metabolic syndrome [40–42]. Thus, mice from the HP group appear to face more liver disturbances than the other groups, in accordance

with data from marmosets with the same oil [24]. Alkaline phosphatase was also significantly increased in HP mice serum, while P and O mice were comparable to C mice. This enzyme is traditionally related to cholestatic injury [43], yet there is evidence of cases of NAFLD with high alkaline phosphatase [44]. Gamma-glutamyl transferase concentration, on the other hand, was not different between the HP and C groups, but was lower in the O and P groups compared to the C group. Low levels of this enzyme in serum are not common in studies or in clinical practice. According to Ndrepepa and Kastrati (2016) [45], gamma-glutamyl transferase's most pivotal role is the cleavage of glutathione, liberating the three amino acids that form it (glutamic acid, cysteine, and glycine) and making it possible for the cell to absorb these amino acids to synthetize glutathione again, or to utilize them in other metabolic pathways. Evidence associates high gamma-glutamyl transferase with cardiovascular diseases [45,46], however, neither of them address the issue of the low serum concentration of this enzyme. In the absence of accurate evidence comprising high-fat diets and glutathione to explain this decrease, we can only hypothesize that this effect we observed is somewhat related to glutathione availability. This elicits further investigation concerning liver gamma-glutamyl transferase, glutathione metabolism, and high-fat diets containing either P or O oils.

Previous studies have compared the consumption of palmitic acid vs. oleic acid, both in rodents [47] and humans, under normal level of lipids. While similar effects on lipid level profiles were found in normocholesterolemic men and women, in rodents, certain differences were found in plasma lipids but not in liver tissue cholesterol levels [47]. Few studies have compared the effects of these fats under high-fat diet conditions. In a recent study, comparing O oil vs. P stearin under a high-fat diet, Meidan et al. [48] found that mice receiving either P or O fats showed an increased body weight, elevated blood glucose levels, and a fatty liver phenotype. In rats, high dietary intake of P oil was found to compromise glucose tolerance, while O compromised liver lipid metabolism and integrity [49]. Overall, the above-mentioned studies regarding lipid metabolism suggest the response to dietary lipids might be exacerbated in the context of a high-fat diet. Moreover, physiological conditions (i.e., obesity) might also influence the response to dietary lipids [50].

To the best of our knowledge, our study is the first to compare the liver transcriptome of mice fed high-fat diets containing O, P, and HP oils. Although we do not discard that response to dietary fats might be different in conditions of high-fat from that of a normal diet, our data suggest that the total amount of fat might be a major driver of transcriptomic changes. Previous studies have evaluated the impact of a high-fat diet on the liver transcriptome [51] in rodents and in agreement with our data, most regulated genes were related to FA metabolism. Regarding inflammatory genes, in accordance with previous works [49], we did not observe major changes in classical inflammatory genes in the liver, including IL-6, IL-1 β , MCP1, or TNF α [48]. Interestingly, cpt1a, a major player in oxidation of FA [52] was down-regulated in the HP group, while the Scd1 gene was up-regulated in both the P and HP groups. Overall, our data suggest that different oils produce a large amount of changes in the liver transcriptome, particularly for the O and HP oils. Which of these changes, at mRNA levels, are a determinant for the biological effects observed in the whole organism, needs further characterization.

Our results suggest that high-fat diets containing MUFA or SFA disturb fat distribution and lipid metabolism in distinct ways, contributing to NAFLD establishment. This indicates that the total amount of fat consumed is the main driver of liver disease development, and the type of fat can distinctly influence the degree of NAFLD developed. The limitations of our study are that it was performed under a high-fat diet context to better resemble the western diet, however, we cannot predict whether these oils would induce the same metabolic disarrangements if animals were fed a diet with normal fat content. In addition, to understand if these results can be translated to humans, further studies involving NAFLD patients and these oils must be performed. Since P oil is the most cultivated, commercialized, consumed, and utilized oil in the world [18] and HP oil is promoted as a healthy alternative for it [22,23], our data suggest that attention must be given to the liver outcomes observed here in mice before boosting these oils as safe and healthy.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Twenty-four male mice (*Mus musculus*), C57Bl/6J, at 8 weeks of age, were used in this study. They were raised and kept at Biotério de Roedores of Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil, and were housed in groups (three animals per cage). The room was controlled, with 12-h light/12-h dark cycle, average temperature of 23 °C \pm 2 and humidity of 50% \pm 5. The animals had free access to food and water.

All procedures followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Ethics Committee for The Use of Animals in Research of Universidade Federal do Rio de Janeiro—UFRJ (protocol number 049/17).

4.2. Experimental Dietetic Protocol

The animals were randomly assigned to one of the four groups, with six animals each: control (C) group, fed with a chow diet (Laboratory Rodent Diet, LabDiet[®]); or one of three high-fat diets (41% fat), differing in the lipid sources: olive oil (O) group, containing olive oil; palm oil (P) group, containing palm oil; or hybrid palm oil (HP) group, containing hybrid palm oil. The high-fat diets were formulated by Prag Soluções (São Paulo, Brazil), following the recommendations of the American Institute of Nutrition for rodents. The formulation of the high-fat diets is described in Table 3. Palm oil and hybrid palm oil were provided by Agropalma (Pará, Brazil). Olive oil was purchased from a local market. All groups were fed for 8 weeks.

Ingredients	g/100 g
Ground corn	8.80
Wheat middlings	8.50
Rice bran	8.00
Sucrose	19.50
Dehulled soybean meal	5.00
Casein	7.00
Powder milk	7.00
Albumin	11.20
Chicken meal	2.90
Soybean oil	2.00
P, HP, or O oils	14.30
Fiber	2.00
Vitamins and minerals mix	3,86
Butylhydroxytoluene	0.02
Kcal/100 g	422.08
Protein	16%
Carbohydrate	43%
Lipid	41%

Table 3. Experimental diet composition shown as g/100 g.

4.3. Body Weight and Computed Tomography

Body mass was measured at the initial day (T0), before the dietary approach, and all across the intervention time. Computed tomography (CT) scans were performed in order to assess adipose tissue and liver images. All animals underwent CT scans at T0 and at the final time (T1), after the diets. The images were taken on Optima PET/CT560 equipment (Milwaukee, WI, USA), located at the Nuclear Medicine Service of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho of Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil), and processed on AW4.6 software. The settings for CT scans were supine position, abdomen window levels (WL) of -173 HU to -109 HU (HU scale calculated specifically for the animals in this study), slices of 0.62 mm, 140 Kv, and 320 mAs. Segmentation of

adipose tissue was performed by Image J.51u software, where a tomography slice of each animal was used to count the Hounsfield unit (HU)-scale pixels corresponding to the fat tissue of the animals. ImageJ is public domain software that is well used in automatic or manual image processing in studies related to adipose tissue segmentation [53–55].

4.4. Biological Sample Collection and Liver Histological Analyzes

At T1, after 4 h of fasting, all animals were anesthetized intraperitoneally with 300 mg/kg of ketamine hydrochloride and 30 mg/kg of xylazine hydrochloride, and blood was collected by cardiac puncture. Subsequently, liver and adipose tissue samples were collected. The blood was centrifuged $(4000 \times g, 4 \,^{\circ}\text{C}, 10 \,\text{min})$ in order to collect serum samples and sent under refrigeration to Laborlife Clinical Analysis (Rio de Janeiro, Brazil) for biochemical analysis, such as total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL), triglycerides, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, and glucose. For these analyses, colorimetric chemical kinetic assays were used with an automated clinical analyzer (Metrolab 2300, Geneva, Switzerland). Liver and adipose tissues were weighted. A liver sample was used for histologic analysis: 100 mg of liver tissue was collected to perform transcriptome analysis, so it was immersed in RNAlater® Stabilization Solution (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions, for further analysis. Then, it was stored at -80 °C, with the rest of the sample. Tissues (defrosted) were fixed in formalin, paraffin embedded, and sections were stained with hematoxylin and eosin. Hematoxylin and eosin staining was used to evaluate the lesion pattern and whether there was any type of cellular immune response. The analyses were made based on the score system of Kleiner et al. [56]. In summary, the histological slices were scanned using a slide scanner (Pannoramic MIDI -3DHISTECH, Budapest, Hungary), where the entire liver tissue sample was evaluated. The results were analyzed by an external expert pathologist and were based on observation of the degree of steatosis, focal inflammation, diffuse inflammation, and nuclear vacuolation. NAFLD activity score (NAS) was performed in order to clarify the stage of liver disease in the animals [56].

4.5. Liver Fat Assessment

To assess liver fat, 200 mg of liver samples were submitted to lipid extraction according to Bligh and Dyer (1959) [57] and was determined by the gravimetric method. Results are expressed as a percentage of the sample.

4.6. Liver Transcriptome

Total mRNA of the liver samples was extracted with a PrepEase[®] kit (Affymetrix), following the manufacturer's instructions. mRNA integrity was assessed with NanoDrop-1000[®] equipment (Thermo Fisher) before microarray-based transcriptomic analyses. Gene expression analysis was performed using Affymetrix Clariom S Mouse Assay microarrays. The R Bioconductor oligo package was used for data processing in conjunction with the pd.clariom.s.mouse annotation package. After background correction and robust multichip average (RMA) normalization, expression data was obtained for a total of 29,129 features and 19 samples. Samples within the same experimental group which correlated poorly were removed. Thus, one sample was removed from C, PH, and O groups, respectively. Then microarray probes were annotated with the corresponding gene symbol, and not available (NA's) gene symbols were removed from the expression matrix. Differential expression levels between experimental groups were assessed with the R Bioconductor limma package. Genes with a false discovery rate (FDR) lower than 0.05 were considered as statistically significant. Gene Ontology (GO) analysis of biological process (BP) was performed using the Panther Database (http://www.pantherdb. org/pathway/) and using GO slim annotation. Only over-represented (or under-represented) GO annotations with an FDR < 0.05 were considered.

4.7. Statistical Analysis

The software GraphPad Prism 7.0 was used for statistical analysis. An ANOVA test, along with a Newman–Keuls post-hoc test were performed, adopting a significance level of $p \le 0.05$. Results are expressed as means \pm standard error of the mean.

5. Conclusions

The consumption of high-fat diets containing either olive, palm, or hybrid palm oils during eight weeks can predispose mice to the development of NAFLD. Olive oil promoted low liver fat accumulation, but prompted lobular inflammation, with transcriptomic modulation of amino acid and fatty acid metabolism. Palm and hybrid palm oils, in other ways, induced not only liver fat accumulation, but also hepatocyte ballooning and lobular inflammation, resembling the nonalcoholic steatohepatitis pattern. Transcriptome alterations in the palm oil-fed group were related to calcium ion homeostasis, whereas in the hybrid palm oil-fed group were related to protein localization. As demonstrated in the present study, high dietary intake of palm and hybrid palm oils can rapidly induce NASH in mice. These results raise concern about the high content of these oils in the most-consumed processed food products around the world.

Author Contributions: Conceptualization, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; methodology, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; formal analysis, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., F.K.A.G., R.M.-H., D.C.M.-E., W.A.F.P., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; investigation, R.C.S., P.C.M., F.K.A.G., R.M.-H., D.C.M.-E., J.G.-Z., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; resources, A.D. and M.G.T.d.C.; data curation, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., R.M.-H., D.C.M.-E., V.A.F.P., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; writing—original draft preparation, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., A.D., M.G.T.d.C.; writing—review and editing, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., F.S., P.C.d.V., A.D., M.G.T.d.C.; writing—review and editing, R.C.S., P.C.M., F.S., P.C.d.V., S.A.L.d.S., A.D. and M.G.T.d.C.; supervision, F.S., P.C.d.V., S.A.L.d.S., A.D., M.G.T.d.C.; project administration, R.C.S., P.C.d.V., S.A.L.d.S., A.D., M.G.T.d.C.; funding acquisition, S.A.L.d.S., A.D., M.G.T.d.C.

Funding: This research was funded by grants provided to Maria G. Tavares do Carmo by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) E-26/111.725/2013 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 305329/2016-2. Coordenação de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) funded a postgraduate scholarship to Rafael C. Sales Finance Code 001. By the Spanish "Agencia Estatal de Investigación" and European FEDER Funds to Alberto Dávalos (AGL2016-78922-R) and by the Fundación Ramón Areces (CIVP18A3888) to Alberto Dávalos, Judit Gil-Zamorano and Roberto Martín-Hernández.

Acknowledgments: Diana C. Mantilla-Escalante is a fellow of "Centro de Estudios Interdisciplinarios Básicos y Aplicados" (CEIBA), Colombia, through the program "Bolivar Gana con Ciencia". The authors wish to thank CAPES for the scholarship awarded to Rafael C. Sales, a postgraduate student of Nutrition at Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

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

Abbreviations

NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NAFL	Nonalcoholic fatty liver
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
FA	Fatty acids
MUFA	Monounsaturated fatty acids
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
SREBP-1	Sterol-regulatory element binding protein 1
TLR	Toll-like receptors
Р	Palm
HP	Hybrid palm
0	Olive
СТ	Computed tomography
NAS	Nonalcoholic fatty liver disease activity score
AST/ALT	Aspartate aminotransferase/alanine aminotransferase
DEG	Differentially expressed genes

SFA	Saturated fatty acids
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin containing 3
Τ0	Initial day
T1	Final time
HU	Hounsfield unit
HDL	High-density lipoprotein cholesterol
LDL	Low-density lipoprotein cholesterol
VLDL	Very low-density lipoprotein cholesterol
GO	Gene ontology
BP	Biological process

References

- Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018, 67, 328–357. [CrossRef] [PubMed]
- Bertot, L.C.; Adams, L. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 774. [CrossRef] [PubMed]
- Lonardo, A.; Byrne, C.D.; Caldwell, S.H.; Cortez-Pinto, H.; Targher, G. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes. *Hepatology* 2016, 64, 1388–1389. [CrossRef] [PubMed]
- Araújo, A.R.; Rosso, N.; Bedogni, G.; Tiribelli, C.; Bellentani, S. Global Epidemiology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease/Non-Alcoholic Steatohepatitis: What We Need in the Future. *Liver Int.* 2018, *38*, 47–51. [CrossRef] [PubMed]
- Caligiuri, A.; Gentilini, A.; Marra, F. Molecular Pathogenesis of NASH. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1575. [CrossRef]
- 6. Fan, J.G.; Cao, H.X. Role of Diet and Nutritional Management in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *28*, 81–87. [CrossRef]
- Nakamura, A.; Terauchi, Y. Lessons From Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 21240–21257. [CrossRef]
- 8. Yasutake, K.; Kohjima, M.; Kotoh, K.; Nakashima, M.; Nakamuta, M.; Enjoji, M. Dietary Habits and Behaviors Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 1756. [CrossRef]
- Westerbacka, J.; Lammi, K.; HäKkinen, A.M.; Rissanen, A.; Salminen, I.; Aro, A.; Yki-JaRvinen, H. Dietary Fat Content Modifies Liver Fat in Overweight Nondiabetic Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 2804–2809. [CrossRef]
- 10. Van Herck, M.; Vonghia, L.; Francque, S. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—A starter's guide. *Nutrients* **2017**, *9*, 1072. [CrossRef]
- 11. Kakimoto, P.A.; Kowaltowski, A.J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 216–225. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Juárez-Hernández, E.; Chávez-Tapia, N.C.; Uribe, M.; Barbero-Becerra, V.J. Role of Bioactive Fatty Acids in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutr. J.* **2015**, *15*, 72. [CrossRef] [PubMed]
- Cansanção, K.; Monteiro, L.S.; Leite, N.C.; Dávalos, A.; Carmo, M.G.T.; Peres, W.A.F. Advanced Liver Fibrosis is Independently Associated with Palmitic Acid and Insulin Levels in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* 2018, 10, 1586. [CrossRef] [PubMed]
- 14. Nagao, K.; Yanagita, T. Bioactive Lipids in Metabolic Syndrome. *Prog. Lipid Res.* **2008**, 47, 127–146. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Georgiadi, A.; Kersten, S. Mechanisms of Gene Regulation by Fatty Acids. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 127–134. [CrossRef] [PubMed]
- 16. Kucera, O.; Cervinkova, Z. Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 8364. [CrossRef]
- Nam, Y.; Jmn, M.; Long, K. Composition and Thermal Analysis of Lard Stearin and Lard Olein. *J. Oleo Sci.* 2011, 60, 333–338. [CrossRef]

- Mba, O.I.; Dumont, M.J.; Ngadi, M. Palm Oil: Processing, Characterization and Utilization in the Food Industry—A Review. *Food Biosci.* 2015, 10, 26–41. [CrossRef]
- Orsavova, J.; Misurcova, L.; Ambrozova, J.V.; Vicha, R.; Mlcek, J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, *16*, 12871–12890. [CrossRef]
- Mancini, A.; Imperlini, E.; Nigro, E.; Montagnese, C.; Daniele, A.; Orrù, S.; Buono, P. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* 2015, 20, 17339–17361. [CrossRef]
- EMBRAPA. BRS Manicoré: Híbrido Interespecífico Entre o Caiaué e o Dendezeiro Africano Recomendado Para Áreas de Incidência de Amarelecimento-Fatal. Available online: https://www.embrapa.br/solos/ busca-de-publicacoes/-/publicacao/867099/brs-manicore-hibrido-interespecifico-entre-o-caiaue-e-odendezeiro-africano-recomendado-para-areas-de-incidencia-de-amarelecimento-fatal (accessed on 13 November 2018).
- 22. Ojeda, M.; Borrero, M.; Sequeda, G.; Diez, O.; Castro, V.; García, Á.; Ruiz, Á.; Pacetti, D.; Frega, N.; Gagliardi, R.; et al. Hybrid Palm Oil (*Elaeis Oleifera* × *Elaeis Guineensis*) Supplementation Improves Plasma Antioxidant Capacity in Humans. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2017**, *119*, 1600070. [CrossRef]
- 23. Lucci, P.; Borrero, M.; Ruiz, A.; Pacetti, D.; Frega, N.G.; Diez, O.; Ojeda, M.; Gagliardi, R.; Parra, L.; Angel, M. Palm Oil and Cardiovascular Disease: A Randomized Trial of the Effects of Hybrid Palm Oil Supplementation on Human Plasma Lipid Patterns. *Food Funct.* **2016**, *7*, 347–354. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Spreafico, F.; Sales, R.C.; Gil-Zamorano, J.; Medeiros, P.C.; Latasa, M.J.; Lima, M.R.; Souza, S.A.L.; Martin-Hernández, R.; Gómez-Coronado, D.; Iglesias-Gutierrez, E.; et al. Dietary Supplementation with Hybrid Palm Oil Alters Liver Function in the Common Marmoset. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2765. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Monteiro, C.A.; Moubarac, J.C.; Cannon, G.; Ng, S.W.; Popkin, B. Ultra-Processed Products are Becoming Dominant in the Global Food System. *Obes. Rev.* **2013**, *14*, 21–28. [CrossRef] [PubMed]
- 26. Hariri, N.; Thibault, L. High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models. *Nutr. Res. Rev.* 2010, 23, 270–299. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Kanuri, G.; Bergheim, I. In Vitro and In Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 11963–11980. [CrossRef] [PubMed]
- 28. Lau, J.K.C.; Zhang, X.; Yu, J. Animal Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Current Perspectives and Recent Advances. J. Pathol. 2017, 241, 36–44. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Monounsaturated Fatty Acids, Olive Oil and Health Status: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Lipids Health Dis.* **2014**, *13*, 154. [CrossRef] [PubMed]
- Elias, S.; Wisam, S.; Luai, A.; Massad, B.; Nimer, A. Lipotoxicity in Obesity: Benefit of Olive Oil. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017, 960, 607–617. [CrossRef] [PubMed]
- Garaulet, M.; Marin, C.; Pérez-Llamas, F.; Canteras, M.; Tebar, F.J.; Zamora, S. Adiposity and Dietary Intake in Cardiovascular Risk in an Obese Population from a Mediterranean Area. *J. Physiol. Biochem.* 2004, 60, 39–49. [CrossRef] [PubMed]
- Benner, K.G.; Sasaki, A.; Gowen, D.R.; Weaver, A.; Connor, W.E. The Differential Effect of Eicosapentaenoic Acid and Oleic Acid on Lipid Synthesis and VLDL Secretion in Rabbit Hepatocytes. *Lipids* 1990, 25, 534–540. [CrossRef] [PubMed]
- 33. De Velasco, P.C.; Chicaybam, G.; Ramos-Filho, D.M.; Dos Santos, R.M.; Mairink, C.; Sardinha, F.L.; El-Bacha, T.; Galina, A.; Do Carmo, M.G.T. Maternal Intake of Trans-Unsaturated or Interesterified Fatty Acids During Pregnancy and Lactation Modifies Mitochondrial Bioenergetics in the Liver of Adult Offspring in Mice. *Br. J. Nutr.* 2017, *118*, 41–52. [CrossRef] [PubMed]
- Zhu, W.; Feng, P.P.; He, K.; Li, S.W.; Gong, J.P. Liraglutide Protects Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Via Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation in a Mouse Model Induced by High-Fat Diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, 505, 523–529. [CrossRef]
- 35. Dowman, J.K.; Hopkins, L.J.; Reynolds, G.M.; Nikolaou, N.; Armstrong, M.J.; Shaw, J.C.; Houlihan, D.D.; Lalor, P.F.; Tomlinson, J.W.; Hübscher, S.G.; et al. Development of hepatocellular carcinoma in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis induced by use of a high-fat/fructose diet and sedentary lifestyle. *Am. J. Pathol.* 2014, 184, 1550–1561. [CrossRef] [PubMed]

- 36. Karin, M.; Dhar, D. Liver carcinogenesis: From naughty chemicals to soothing fat and the surprising role of NRF2. *Carcinogenesis* **2016**, *37*, 541–546. [CrossRef]
- 37. Zhang, H.; Temel, R.E.; Martel, C. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism: Early Career Committee Contribution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 1791–1794. [CrossRef] [PubMed]
- 38. Katan, M.B.; Zock, P.L.; Mensink, R.P. Effects of Fats and Fatty Acids on Blood Lipids in Humans: An Overview. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, S1017–S1022. [CrossRef] [PubMed]
- 39. Sparks, J.D.; Sparks, C.E.; Adeli, K. Selective Hepatic Insulin Resistance, VLDL Overproduction, and Hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2104–2112. [CrossRef] [PubMed]
- 40. Giannini, E.; Botta, F.; Fasoli, A.; Ceppa, P.; Risso, D.; Lantieri, P.B.; Celle, G.; Testa, R. Progressive Liver Functional Impairment is Associated With an Increase in AST/ALT Ratio. *Dig. Dis. Sci.* **1999**, *44*, 1249–1253. [CrossRef]
- 41. Zhao, L.; Cheng, J.; Chen, Y.; Li, Q.; Han, B.; Chen, Y.; Xia, F.; Chen, C.; Lin, D.; Yu, X.; et al. Serum Alanine Aminotransferase/Aspartate Aminotransferase Ratio Is One Of The Best Markers Of Insulin Resistance In The Chinese Population. *Nutr. Metab. (London)* **2017**, *14*, 64. [CrossRef]
- Yadav, D.; Choi, E.; Ahn, S.V.; Baik, S.K.; Zoo Cho, Y.; Koh, S.B.; Huh, J.H.; Chang, Y.; Sung, K.C.; Kim, J.Y. Incremental Predictive Value of Serum AST-to-ALT Ratio for Incident Metabolic Syndrome: The ARIRANG Study. *PLoS ONE* 2016, *11*, E0161304. [CrossRef] [PubMed]
- 43. Kwo, P.Y.; Cohen, S.M.; Lim, J.K. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 18. [CrossRef] [PubMed]
- 44. Pantsari, M.W.; Harrison, S.A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Presenting with an Isolated Elevated Alkaline Phosphatase. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40*, 633–635. [CrossRef] [PubMed]
- 45. Ndrepepa, G.; Kastrati, A. Gamma-Glutamyl Transferase and Cardiovascular Disease. *Ann. Transl. Med.* **2016**, *4*. [CrossRef] [PubMed]
- 46. Ndrepepa, G.; Colleran, R.; Kastrati, A. Gamma-Glutamyl Transferase and the Risk of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. *Clin. Chim. Acta* **2017**, *476*, 130–138. [CrossRef]
- 47. Kris-Etherton, P.M.; Ho, C.Y.; Fosmire, M.A. The Effect of Dietary Fat Saturation on Plasma and Hepatic Lipoproteins in the Rat. *J. Nutr.* **1994**, *114*, 1675–1682. [CrossRef]
- Meidan, E.; Kolesnikov, Y.; Tirosh, O. High Fat Diets Composed of Palm Stearin and Olive Oil Equally Exacerbate Liver Inflammatory Damage and Metabolic Stress in Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 1700915. [CrossRef]
- Djohan, Y.F.; Badia, E.; Bonafos, B.; Fouret, G.; Lauret, C.; Dupuy, A.M.; Pinot, E.; Sutra, T.; Gaillet, S.; Lambert, K.; et al. High Dietary Intake of Palm Oils Compromises Glucose Tolerance Whereas High Dietary Intake of Olive Oil Compromises Liver Lipid Metabolism and Integrity. *Eur. J. Nutr.* 2018, 1–17. [CrossRef]
- Lopes, L.L.; Rocha, D.M.U.; Silva, A.D.; Peluzio, M.D.C.G.; Bressan, J.; Hermsdorff, H.H.M. Postprandial Lipid Response to High-Saturated and High-Monounsaturated Fat Meals in Normal-Weight or Overweight Women. J. Am. Coll. Nutr. 2018, 37, 308–315. [CrossRef]
- 51. Roberts, M.D.; Mobley, C.B.; Toedebush, R.G.; Heese, A.J.; Zhu, C.; Krieger, A.E.; Cruthirds, C.L.; Lockwood, C.M.; Hofheins, J.C.; Wiedmeyer, C.E.; et al. Western Diet-Induced Hepatic Steatosis and Alterations in the Liver Transcriptome in Adult Brown-Norway Rats. *BMC Gastroenterol.* 2015, *15*, 151. [CrossRef]
- 52. Eaton, S.; Bartlett, K.; Quant, P.A. Carnitine Palmitoyl Transferase I and the Control of B-Oxidation in Heart Mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 537–539. [CrossRef] [PubMed]
- 53. Pop, M.; Raluca, P. Using Abdominal CT Data for Visceral Fat Evaluation. *Acta Med. Marisiensis* **2013**, *59*, 254–256. [CrossRef]
- Irving, B.A.; Weltman, J.Y.; Brock, D.W.; Davis, C.K.; Gaesser, G.A.; Weltman, A. NIH Imagej And Slice-O-Matic Computed Tomography Imaging Software To Quantify Soft Tissue. *Obesity (Silver Spring)* 2007, 15, 370–376. [CrossRef] [PubMed]
- 55. Van Vugt, J.L.; Levolger, S.; Gharbharan, A.; Koek, M.; Niessen, W.J.; Burger, J.W.; Willemsen, S.P.; De Bruin, R.W.; Ijzermans, J.N. A Comparative Study of Software Programmes for Cross-Sectional Skeletal Muscle and Adipose Tissue Measurements on Abdominal Computed Tomography Scans of Rectal Cancer Patients. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2017, 8, 285–297. [CrossRef] [PubMed]

- 18 of 18
- Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A.; et al. Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* 2005, 41, 1313–1321. [CrossRef] [PubMed]
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).