

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

***PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO HEPÁTICO DE  
RATOS SUBMETIDOS À DIETA CETOGÊNICA RICA EM  
TRIENANTINA***

**INGRID SOFIA VIEIRA DE MELO**

**MACEIÓ-2011**

**INGRID SOFIA VIEIRA DE MELO**

***PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO HEPÁTICO DE  
RATOS SUBMETIDOS À DIETA CETOGÊNICA RICA EM  
TRIENANTINA***

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Nutrição da Universidade Federal de  
Alagoas como requisito à obtenção do título  
de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

**MACEIÓ-2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**MESTRADO EM NUTRIÇÃO**



Campus A. C. Simões  
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins  
Maceió-AL 57072-970  
Fone/fax: 81 3214-1160

---

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO TECIDO HEPÁTICO DE RATOS**  
**SUBMETIDOS À DIETA CETOGÊNICA RICA EM TRIENANTINA**

por

**Ingrid Sofia Vieira de Melo**

A Banca Examinadora, reunida aos 26 (vinte e seis) dias do mês de janeiro de 2011, considera a candidata \_\_\_\_\_.

---

Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho  
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas  
(Examinador)

---

Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas  
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Alagoas  
(Examinador)

## DEDICATÓRIA

*Dedicado aos meus pais, Nizele e Luiz, por todo amor, ajuda constante, seres incansáveis no ato de incentivar, ao meu amado irmão Ítalo, querido Nassib e todos os cidadãos e cidadãs que me permitem buscar o saber científico.*

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me permitir viver; ter todos os subsídios possíveis que qualquer ser humano deseja, tornando-me uma pessoa privilegiada.
- Agradeço aos meus pais, verdadeiros presentes! Jamais esquecerei o amor, carinho, incentivo, compreensão, e, sobretudo por buscar meus sonhos comigo.
- Agradeço a meu irmão Ítalo Vantuyl V. de Melo, uma das pessoas que mais torcem por mim.
- Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde e minha co-orientadora Profa. Dra. Suzana Lima de Oliveira, por serem sempre exemplos de profissionalismo, ética adequada e coerência; pessoas incansáveis, doces, amáveis e donas de um bom humor constante.
- Agradeço também a todos os familiares e amigos que viveram comigo as dificuldades do período.
- Agradeço a Nassib B. Bueno, pelo constante companheirismo e carinho.
- Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa de estudo.
- Agradeço a todos os cidadãos e cidadãs, que embora não saibam, contribuem para que alguns privilegiados estejam em Universidades públicas, espero retribuir o mais breve possível.

## RESUMO

Os lipídios dietéticos determinam a incorporação e a composição em ácidos graxos do organismo, especialmente em órgãos mais susceptíveis a sua ação moduladora sobre os ácidos graxos esterificados a fosfolipídios de membrana, como, por exemplo, o fígado. Dietas cetogênicas, amplamente utilizadas para o tratamento de diversas desordens, normalmente utilizam triacilgliceróis de cadeia longa, porém, triacilgliceróis de cadeia média são considerados uma fonte alternativa, visto que são digeridos, absorvidos, oxidados e removidos da circulação mais rapidamente que os de cadeia longa. Além disso, levam à formação de corpos cetônicos de forma acelerada, não sofrendo a influência de fatores hormonais ou nutricionais. Visando contribuir com a discussão, a presente dissertação apresenta um capítulo de revisão, intitulado *Disfunção mitocondrial na doença do fígado gorduroso não alcoólica*, que reúne informações sobre o estresse oxidativo e a conseqüente disfunção mitocondrial, no contexto desta doença hepática. E, um artigo original, intitulado *Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos à dieta cetogênica rica em trienantina*, que discute os efeitos de dieta cetogênica à base de trienantina, um triacilglicerol homogêneo do ácido enântico (heptanóico), ou de óleo de soja, sobre tal perfil. Os fígados dos animais alimentados com as dietas cetogênicas apresentaram redução significativa na concentração de ácidos graxos monoinsaturados, 9-hexadecenóico e 9-octadecenóico, quando comparados ao grupo Controle, sugerindo uma possível redução na atividade da enzima Estearoil-CoA Dessaturase 1. Adicionalmente, o grupo alimentado com trienantina apresentou aumento dos níveis de ácido octadecanóico, quando comparado ao grupo Controle. Assim, a trienantina, em proporções cetogênicas, exerceu efeito modulador similar ao do óleo de soja, um óleo convencional largamente utilizado, apesar das diferenças na composição em ácidos graxos entre essas duas fontes lipídicas. Neste estudo constatou-se que os ratos alimentados com dieta cetogênica sofreram modulação do perfil em ácidos graxos dos lipídios hepáticos e que, nas condições aqui estabelecidas, tal modulação se deveu especialmente à natureza cetogênica da dieta *per si* e não ao tipo de óleo empregado em sua elaboração.

**Palavras-chave:** *dieta cetogênica, trienantina, triacilglicerol de cadeia média.*

## ABSTRACT

Dietary lipids determine the incorporation and fatty acid composition of the organism, especially in organs most susceptible to its modulating action on membrane phospholipids esterified fatty acids, such as the liver. Ketogenic diets, widely used to treat various disorders, often use long-chain triacylglycerols, however, medium chain triglycerides are considered an alternative source, since they are digested, absorbed, oxidized and removed from circulation more rapidly than long chain triacylglycerols. In addition, it lead to the formation of ketone bodies quickly, without the influence of hormonal or nutritional factors. To contribute to the discussion, this paper presents a review chapter, entitled *Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease*, which gathers information on oxidative stress and consequent mitochondrial dysfunction in the context of liver disease. It also presents an original article, entitled *Fatty acid profile in liver tissue of rats subjected to ketogenic diet rich in trienantin*, which discusses the effects of a ketogenic diet based on trienantin, a homogeneous triacylglycerol composed of enantic (heptanoic) acid, or based on soybean oil on this profile. The livers of animals fed the ketogenic diet showed a significant reduction in the concentration of monounsaturated fatty acids, 9-hexadecenoic and 9-octadecenoic compared to control group, suggesting a potential reduction in the activity of the enzyme Stearoil-CoA Desaturase 1. Additionally, the group fed trienantin showed increased levels of octadecanoic acid compared to control group, which corroborated the hypothesis of decreased enzyme activity in this group. Thus trienantin in ketogenic proportions exerted modulatory effects similar to soybean oil, widely used conventional oil, despite the differences in fatty acid composition between these two fat sources. The study showed that rats fed a ketogenic diet experienced modulation of fatty acid profile of hepatic lipids and that in the conditions set forth herein, this modulation was due especially to the nature of the ketogenic diet itself and not to the type of oil used in their preparation.

**Keywords:** Ketogenic diet, trienantin, medium-chain triacylglycerol.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo de revisão

<b>Figura 1</b>	Metabolismo lipídico hepático normal.....	17
<b>Figura 2</b>	Inibição da Carnitina Palmitoil Transferase 1 (CPT-1) pelo Malonil-CoA .....	20

### Artigo de resultados

<b>Figura 1</b>	Trienantina (trieptanoína).....	31
-----------------	---------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Escores médios percentuais de diferentes ácidos graxos do tecido hepático dos ratos submetidos às dietas controle, cetotAGC <sub>7</sub> e cetotAGsoja.....	36
<b>Tabela 2</b>	Valores percentuais aproximados dos ácidos graxos mais abundantes nas dietas oferecidas aos animais dos grupos Controle, CetoTAGC <sub>7</sub> e CetoTAGsoja.....	36

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AG** – Ácido(s) graxo(s)

**AGCL** – Ácido(s) graxo(s) de cadeia longa

**AGCM** – Ácido(s) graxo(s) de cadeia média

**AGL** – Ácidos graxos livres

**AGMI** – Ácido graxo monoinsaturado

**BHT** – hidroxitolueno butilado

**CPT-1** – Carnitina palmitoil transferase 1

**DFGNA** – Doença do fígado gorduroso não alcoólica

**EH** – Esteatose hepática

**EHNA** – Esteatoepatite não alcoólica

**ERO** – Espécies reativas de oxigênio

**FRAP** – Capacidade redutora de sal férrico

**MDA** – Malonaldeído

**NF-KB** – Fator nuclear kappa B

**PPAR** – Receptores de proliferadores de peroxissomos

**SCD1** – Esteroil-CoA dessaturase

**TAG** – Triacilgliceróis

**TBARS** – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCL** – Triacilgliceróis de cadeia longa TCL

**TCM** – Triacilgliceróis de cadeia média

**TNF- $\alpha$**  – Fator alfa de necrose tumoral

**VLDL** – Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
<b>2. CAPÍTULO DE REVISÃO.....</b>	<b>14</b>
<i>Disfunção mitocondrial na doença do fígado gorduroso não alcoólica</i>	
<b>3. ARTIGO DE RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<i>Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos à dieta cetogênica rica em trienantina</i>	
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>43</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>6. APÊNDICES.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A ingestão de lipídios produz efeitos metabólicos que são intimamente modulados por variações individuais, quantidade total ingerida e pela composição em ácidos graxos (AG) da dieta (GERMAN e DILLARD, 2004).

Os seres humanos modernos são os únicos animais em que o tipo de alimento consumido pode variar drasticamente entre os membros da sua própria espécie. Entre os animais selvagens, embora a quantidade de alimentos possa variar, é provável que o perfil em ácidos graxos dietéticos mantenha relativa constância. Em contrapartida, para os humanos, a consequência da variação de alimentos está diretamente relacionada, dentre outros fatores, à variação do perfil em ácidos graxos dietéticos, que pode se traduzir em inúmeros efeitos sobre a composição de lipídios de membrana (HULBERT et al., 2005).

Alterações na composição de ácidos graxos de tecidos como o fígado podem influenciar o metabolismo lipídico e regular processos inflamatórios em mamíferos (ARAYA et al., 2004; LEVY et al., 2004; ALWAYN et al., 2005; ALLARD et al., 2008). Além da dieta, especialmente quando em proporções cetogênicas, ou seja, rica em lipídios, essas alterações podem ser conduzidas por alta taxa de peroxidação lipídica ou pela diminuição da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de tais substâncias (ARENDETT et al., 2009).

Atualmente, as dietas cetogênicas são amplamente utilizadas para o tratamento de diversas desordens. Os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) são normalmente utilizados na formulação de dietas ricas em lipídios, porém, triacilgliceróis de cadeia média (TCM) têm sido considerados uma fonte alternativa, visto que são digeridos, absorvidos, oxidados e removidos da circulação mais rapidamente, em relação aos TCL. Além disso, quando metabolizados pelo fígado, os TCM levam à formação de corpos cetônicos de forma acelerada, não sofrendo a influência de fatores hormonais

ou nutricionais (LUCENA et al., 2010). No entanto, dadas às proporções cetogênicas, deve-se estar atento não apenas para a possibilidade de importante modulação do perfil em ácidos graxos do tecido hepático, como, também, de acúmulo de gordura no órgão, predispondo o indivíduo ao quadro de esteatose hepática, o primeiro evento da doença do fígado gorduroso não alcoólica.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou chamar a atenção para a importância dos lipídios hepáticos, não como fatores hepatotóxicos em si, porém, como marcadores do aumento da exposição hepática a ácidos graxos livres, possíveis indutores de hepatotoxicidade. O primeiro capítulo, intitulado *Disfunção mitocondrial na doença do fígado gorduroso não alcoólica*, reúne informações da literatura científica que relacionam o estresse oxidativo e a conseqüente disfunção mitocondrial, com a progressão da esteatose hepática para a forma mais grave da doença, esteatoepatite não alcoólica.

O segundo capítulo é constituído por um artigo original, fruto de um estudo experimental intitulado *Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos à dieta cetogênica rica em trienantina*, que investigou a modulação do perfil em ácidos graxos do fígado de ratos *Wistar*, pela composição em ácidos graxos da dieta, corroborando a influência destes na composição biológica, logo, na função do órgão. Para o estudo, utilizou-se um óleo experimental, constituído pelo TCM trienantina, que se apresenta promissor no tratamento de desordens metabólicas, ou o óleo de soja, amplamente utilizado pela população.

**2 CAPÍTULO DE REVISÃO**

*Disfunção mitocondrial na doença do fígado gorduroso não alcoólica*

## Introdução

A doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA) é uma condição clinicopatológica que abrange um espectro de doenças hepáticas, que inclui o acúmulo de triacilgliceróis (TAG) nos hepatócitos, a esteatose hepática (EH), e a esteato-hepatite não alcoólica (BROWNING e HORTON, 2004; FESTI et al., 2004; PURI et al., 2007; KIM, et al., 2010).

Dados epidemiológicos sobre a DFGNA indicam que é uma lesão hepática bastante freqüente em indivíduos de países ocidentais (REID, 2001) e estima-se que 70% de obesos e diabéticos podem apresentar EH, enquanto que a prevalência na população geral é em torno de 15-25% (BEGRICHE et al., 2006). Esta condição é frequentemente benigna, porém, em 20 a 30% dos casos os pacientes evoluem para a esteatoepatite não alcoólica (EHNA), quadro caracterizado por acúmulo de lipídios no fígado, inflamação e balonização (forma especial de degeneração das células hepáticas associadas com “inchaço” e aumento das células, com formato característico de balão) (CONTOS e SANYAL, 2002; REID, 2001; LACKNER et al. 2008). O que antes parecia ser uma doença exclusiva de adultos, tem se manifestado em outras faixas etárias, como nas crianças (FLEGAL et al., 2001; RASHID e ROBERTS, 2000), aumentando cada vez mais a preocupação dos pesquisadores e profissionais de saúde.

O acúmulo de TAG no hepatócito está relacionado à síndrome metabólica, a drogas, a fatores nutricionais, a defeitos genéticos do metabolismo energético e à resistência à insulina, sendo esta última a mais comum desordem associada à DFGNA (ANGULO, 2002; CHITTURI et al., 2002; SANYAL et al., 2001). Estes fatores podem determinar perturbações intimamente ligadas ao metabolismo lipídico anormal, influenciando, conseqüentemente, vários processos celulares, tais como, sinalização insulínica, lipogênese *de novo*, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo (CHEUNG e SANYAL, 2008; SANYAL et al., 2001; WANG et al., 2006; WEI et al., 2006).

A progressão de EH para EHNA permanece ainda pouco esclarecida (ALBANO, 2005). A hipótese mais aceita atualmente foi proposta por Day e James, em 1998, chamada modelo dos dois *hits*. O primeiro se refere ao mecanismo que causa a EH, ou a agressão inicial. A resistência à insulina, por exemplo, caracterizada por hiperinsulinemia, favoreceria a lipólise no tecido adiposo, aumentando excessivamente

o aporte de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, podendo resultar em EH. Este *hit* deixa o hepatócito mais vulnerável ao segundo, desencadeado por agressões promovidas por vírus, álcool e lipopolissacarídeos, dentre outros, que promovem estresse oxidativo hepático, levando à EHNA (CONTOS e SANYAL, 2002; PURI et al., 2007). Jou et al. (2008) propõem, ainda, um terceiro *hit*, caracterizado pela morte do hepatócito, o qual, segundo os autores, é o mais importante, visto que é responsável pela progressão de EHNA à cirrose.

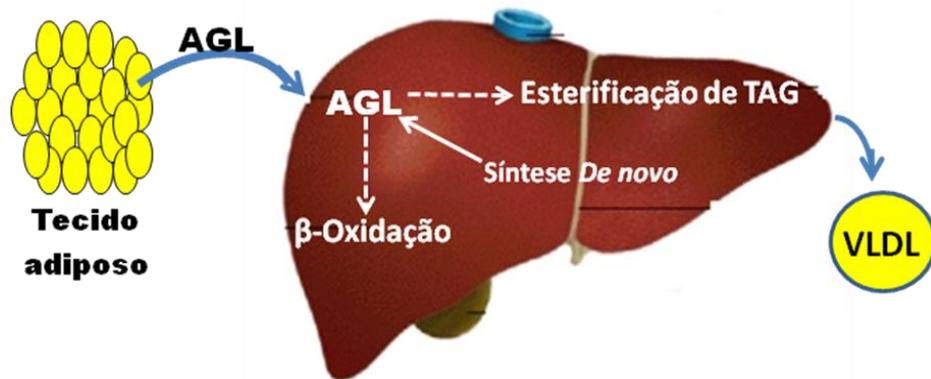
Alguns estudos demonstraram que mesmo a injúria hepática inicial é mediada pelo estresse oxidativo, um dos suspeitos de desempenhar papel crucial na progressão de EH à EHNA, além de endotoxinas e citocinas. Há fortes evidências de que o estresse oxidativo exerce papel central na patogênese da EHNA; o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) causa peroxidação lipídica, que segue acompanhada de resposta inflamatória e ativação de células estreladas, desencadeando, desta forma, fibrinogênese e fibrose hepática (CHITTURI e FARRELL, 2001; MEHTA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006; TILG e DIEHL, 2000; WIGG et al., 2001; YANG et al., 2000).

A mitocôndria, responsável pela fosforilação oxidativa, em condições normais produz pequenas quantidades de ERO. Apesar de pequena, a formação mitocondrial coloca tal organela em posição de maior fonte destas espécies reativas, que, como já mencionado, podem causar peroxidação lipídica, além de danificar proteínas mitocondriais e inibir a transferência de elétrons, através da cadeia respiratória. Este fato culmina com a exacerbação da formação de ERO e com a depleção de antioxidantes, prejudicando a sua inativação (KOJIMA, 2007; PESSAYRE et al., 2001; SANYAL et al., 2001).

## **Estresse oxidativo e DFGNA**

O metabolismo lipídico normal do fígado compreende três mecanismos principais: (1) captura hepática e síntese *de novo* de ácidos graxos livres (AGL), (2) eliminação de AGL, através de oxidação e de síntese de TAG, e (3) exportação de TAG dos hepatócitos, através das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (DUVNJAK et al., 2007). A ingestão de lipídios e a lipólise no tecido adiposo geram AGL, que se dirigem ao fígado. Nos hepatócitos, os AGL sofrem esterificação e formam

os TAG que são, finalmente, empacotados e armazenados como vacúolos no citosol dos hepatócitos ou liberados na corrente sanguínea, através de VLDL (Figura 1). Os que não formam TAG são metabolizados por oxidação, que ocorre em mitocôndrias, peroxissomos e microsossomos (JOU et al., 2008).



**Figura 1.** Metabolismo lipídico hepático normal.  
Fonte: adaptado de Jou et al. (2008).

Os fatores implicados no desenvolvimento da EHNA são divididos em dois grandes grupos: fatores que causam o aumento do estresse oxidativo e fatores que promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (BROWNING e HORTON, 2004). Recentemente, o estresse oxidativo tem recebido atenção especial como um mecanismo comum em várias doenças hepáticas; a ele tem sido atribuído um papel central na patogênese da EHNA, devido à indução da peroxidação lipídica, recrutamento de células inflamatórias, ativação de células estreladas e modificação de enzimas antioxidantes, resultando na progressão da DFGNA (DAY e JAMES, 1998; KORUK et al., 2004; MADAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; PERLEMUTER et al., 2005; SANYAL et al., 2001; SEKI et al., 2005).

Koruk et al. (2004), investigando a associação entre grau de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes séricas no desenvolvimento da EHNA, encontraram níveis significativamente maiores de malonaldeído (MDA) em pacientes com EHNA, quando comparados ao grupo controle. O MDA é um bom indicador da peroxidação lipídica, cujos produtos alteram o DNA mitocondrial e reagem com proteínas mitocondriais, com

prejuízo da cadeia respiratória, aumento do nível de ERO e, conseqüentemente, da peroxidação lipídica (PESSAYRE et al., 2001).

Em outro estudo, Seki et al. (2002), ao utilizar anticorpos monoclonais em um ensaio imuno-histoquímico para quantificar a peroxidação lipídica e o dano oxidativo ao DNA em hepatócitos de indivíduos normais, ou de portadores de esteatose, ou de EHNA, encontraram que quanto mais grave o comprometimento hepático, mais evidentes eram o dano oxidativo ao DNA e a peroxidação lipídica, tendo as amostras com EHNA apresentado maior quantidade desses dois indicadores, que as amostras com esteatose. As amostras de fígados normais não apresentaram nenhum dos dois marcadores. Os autores observaram, ainda, através de parâmetros histológicos, que a peroxidação lipídica estava diretamente relacionada com o grau de necroinflamação e fibrose hepática, enquanto que o dano oxidativo ao DNA estava relacionado com a necroinflamação, apenas.

Bhardwaj et al. (2008), por sua vez, encontraram níveis significativamente maiores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador da peroxidação lipídica, em indivíduos com a DFGNA, quando comparados com indivíduos normais. Segundo os autores, o estresse oxidativo parece ser o destacado segundo *hit*, dentre os responsáveis pela progressão da doença, provavelmente através da indução das oxidases microsossomais pelos ácidos graxos, abundantes no fígado de indivíduos com a DFGNA, que podem, então, causar dano mediado pela produção de radicais livres. Os autores encontraram, ainda, capacidade redutora plasmática de sal férrico (FRAP), um indicador do estado antioxidante corporal, significativamente elevada nos indivíduos com a DFGNA, um fato conflitante, visto que era esperado que estes indivíduos tivessem capacidade antioxidante reduzida. O aumento desse indicador pode representar uma tentativa corporal de se proteger do estresse oxidativo, o que, no entanto, não foi efetivo, visto que os níveis de TBARS estavam elevados. Tais níveis e, conseqüentemente, o de estresse oxidativo, se correlacionaram positivamente com os de bilirrubina, um marcador de lesão hepática, sugerindo um papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da DFGNA.

Alguns estudos sobre a relação entre óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot-}$ ) e EHNA encontraram resultados interessantes. Evidenciaram-se níveis significativamente maiores de óxido nítrico nos indivíduos com EHNA, quando comparados com os indivíduos controle. É postulado que o óxido nítrico pode desempenhar um papel na etiologia da EHNA, potencializando a citotoxicidade (CLEMENS, 1999; GARCIA-MONZON, 2000). No

entanto, em outro estudo, não foi encontrada correlação entre os níveis de óxido nítrico e a severidade histológica da doença (KORUK et al., 2004).

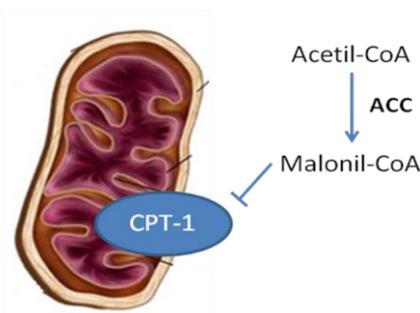
O dano celular induzido pelo estresse oxidativo, especialmente o dano mitocondrial, tem sido aceito como causa da progressão de esteatose para necroinflamação e fibrose (ANGULO, 2002; MARCHESINI e FORLANI, 2002). Evidências sugerem, ainda, que o estresse oxidativo afeta a  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e impede a formação e secreção de lipoproteínas hepáticas, através do aumento da degradação intra-hepática das ApoB100 recém sintetizadas, o que culminaria com a DFGNA (PESSAYRE e FROMENTY, 2005).

Os principais alvos das ERO são os lipídios, os ácidos nucléicos e as proteínas. Os AGL, especificamente, podem induzir hepatotoxicidade e estimular a progressão de esteatose à EHNA, por vários mecanismos; níveis aumentados de ácidos graxos no citoplasma parecem induzir estresse oxidativo. Os AGL podem ser diretamente citotóxicos ou desencadear a produção de citocinas, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (KOJIMA et al., 2007). Feldstein et al. (2004) demonstraram que a simples incubação de células HepG2, linhagem de células de hepatoblastoma bem diferenciadas, em um meio contendo ácido graxo, aumentou a permeabilidade lisossomal e desencadeou a síntese de TNF- $\alpha$ . Essa citocina ativa vários mecanismos de sinalização, induzindo apoptose, ativação de células estreladas e acúmulo hepático de células inflamatórias (BEGRICHE et al., 2006).

Os AGL são, ainda, ligantes naturais de receptores nucleares hormonais, tais como os receptores de proliferador de peroxissomos (PPAR), nas formas  $\alpha$  e  $\gamma$  (BOCHER et al., 2002; RUAN e LODISH, 2003). O PPAR- $\alpha$ , expresso no fígado, músculos, coração e rins, estimula a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias, microsossomos e peroxissomos. O PPAR- $\gamma$ , por sua vez, inibe a ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), bloqueando a produção de TNF- $\alpha$ , diminuindo, dessa forma, a inflamação (BOCHER et al., 2002; MAEDA et al., 2001). O acúmulo de AGL pode, também, romper a regulação de genes sensíveis a receptores nucleares hormonais, que modulam o metabolismo celular, a viabilidade e a síntese de mediadores inflamatórios (CHOI et al., 2007). Porém, é importante salientar que os TAG, *per si*, não são hepatotóxicos, ao contrário, são biomarcadores de aumento da exposição hepática a AGL, potencialmente tóxicos (JOU et al., 2008).

## A mitocôndria hepática na EH e na EHNA

Os ácidos graxos chegam ao fígado através da sua liberação a partir do tecido adiposo ou são obtidos pela hidrólise hepática de TAG dos remanescentes de quilomicrons, além dos provenientes da síntese *de novo*. Os ácidos graxos podem entrar na mitocôndria para sofrer  $\beta$ -oxidação ou ser re-esterificados em TAG. Os triacilgliceróis hepáticos, por sua vez, podem ser estocados ou secretados, através das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ricas em apolipoproteína B. A entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria depende da enzima carnitina palmitoil transferase I (CPT-1), presente nas membranas mitocondriais, cuja atividade é inibida pelo malonil-CoA, formado a partir de acetil-CoA, pela ação da acetil-CoA carboxilase, na primeira etapa da síntese de ácidos graxos (Figura 2). Após uma refeição rica em carboidratos, o aumento dos níveis de glicose e de insulina causa acentuada síntese de ácidos graxos. Nestas circunstâncias, altos níveis de malonil-CoA inibem a CPT-1, diminuindo, conseqüentemente, a  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos (BEGRICHE et al., 2006).



**Figura 2.** Inibição da Carnitina Palmitoil Transferase 1 (CPT-1) pelo Malonil-CoA.  
ACC: Acetil-CoA Carboxilase.

Numa situação de acúmulo, a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e a oxidação de glicose, isoladamente, podem levar à importante geração de ERO na mitocôndria, constituindo-se, assim, o principal sítio produtor dessas espécies, provavelmente pelo aumento da quantidade de equivalentes redutores disponíveis para a transferência de elétrons, dentro da cadeia respiratória. A disfunção mitocondrial induzida por ERO tem

sido relatada em ratos geneticamente obesos e diabéticos, apesar do local preciso da produção destas espécies reativas ainda não ter sido determinada (DU et al., 2000; ST-PIERRE et al., 2002; YAMAGISHI et al., 2001; YANG et al., 2000).

A disfunção mitocondrial reveste-se de substancial importância, tanto no acúmulo de TAG no hepatócito (1° *hit*) e, portanto, na indução de esteatose, quanto na excessiva produção de espécies reativas, induzindo peroxidação lipídica, podendo resultar em EHNA (2° *hit*) (PESSAYRE et al., 2001; KOJIMA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; SANYAL et al., 2001). O prejuízo crônico da  $\beta$ -oxidação mitocondrial pode causar tanto a esteatose macrovesicular quanto a forma mais severa, a microvesicular, e aumentar a formação de ERO. O aumento de ERO pode realçar os depósitos de gordura oxidada, causando um ciclo vicioso com mais peroxidação lipídica, mais dano mitocondrial e mais formação de ERO. As ERO oxidam os depósitos de gordura, liberando produtos da peroxidação lipídica, que danificam o DNA e proteínas, bloqueando parcialmente o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, levando a maior formação de ERO. Adicionalmente, as ERO formadas podem depletar as espécies antioxidantes e causar a formação de TNF- $\alpha$ , efeitos que aumentam o prejuízo ao fluxo de elétrons e, mais uma vez, aumentam as ERO mitocondriais (OLIVEIRA et al., 2006).

Caldwell et al. (2004) sugerem que a “saúde” mitocondrial possivelmente depende de múltiplos fatores, entre eles a integridade do DNA mitocondrial, o nível e a composição de lipídios celulares, o equilíbrio de fatores pró e antioxidantes e fatores anti e pro apoptóticos, além das próprias demandas metabólicas do órgão, levando a crer que a disfunção mitocondrial perfaz parte considerável da fisiopatologia e patogênese da DFGNA.

Kojima et al. (2007) defendem que tanto a simples EH quanto a EHNA são resultado de exposição ao estresse oxidativo, apesar de expressarem resultados diferentes. De modo especial, a EHNA pode estar associada ao menor transporte da enzima manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) nas mitocôndrias hepáticas, devido a um polimorfismo do gene da enzima, desencadeado na própria mitocôndria. Adicionalmente, em portadores de EHNA o sistema antioxidante está fragilizado, a mitocôndria hepática pode estar ainda mais vulnerável, mesmo a pequenas quantidades de ERO, resultando em excessiva produção destas espécies, o que levaria ao agravamento do quadro de EHNA. Os autores vão além, indicando em seu estudo experimental, que buscou investigar o papel das anormalidades mitocondriais

na EHNA, em relação ao estresse oxidativo, que disfunções mitocondriais são observadas em pacientes com EHNA e podem sim estar associadas com o estresse oxidativo (KOJIMA et al., 2007).

A  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos pode estar aumentada na DFGNA associada à resistência à insulina, propiciando a geração de ERO, que, num ambiente com abundância de lipídios, leva à peroxidação lipídica, inflamação e necrose (BEGRICHE et al., 2006; KOVACS e STUMVOLL, 2005; MORIEL et al., 2000). Os mecanismos que explicam o aumento da  $\beta$ -oxidação mitocondrial na DFGNA parecem ainda pouco entendidos, porém, várias hipóteses podem ser levantadas. A primeira seria o excesso de ácidos graxos disponíveis, devido ao aumento na captação de AGL pelo fígado; outra hipótese seria a ativação hepática da expressão de PPAR- $\alpha$ . Dados recentes sugerem que a PPAR- $\alpha$  pode ser preferencialmente ativada por ácidos graxos sintetizados no fígado a partir de carboidratos, mas não por ácidos graxos do tecido adiposo. Ao que parece, a PPAR- $\alpha$  reduz os triacilgliceróis no fígado de vários modelos de roedores portadores de EHNA associada à obesidade e à resistência à insulina. Porém, o aumento basal deste fator nuclear parece não ser suficiente para remover o excesso de lipídios (BEGRICHE et al., 2006).

A peroxidação lipídica, a oxidação ou a mutação do DNA mitocondrial (DNAmt), a indução de citocinas pró-apoptóticas, o aumento da permeabilidade mitocondrial e a diminuição da fosforilação oxidativa podem ser causados pelo excesso de ERO (HASSANEIN, 2004). A disfunção mitocondrial é caracterizada pela abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial, localizados na membrana mitocondrial interna. Esta abertura promove o esgotamento da força motriz de prótons, permitindo que mais carga positiva chegue ao espaço intermembranar. Isto resulta na liberação de múltiplas proteínas a partir do espaço mitocondrial intermembranar para o citosol, levando à ativação da caspase, a perturbações da cadeia respiratória, à diminuição do potencial transmembrana mitocondrial, à produção de radicais livres, e à perda da integridade estrutural da mitocôndria (LI et al., 2008; PESSAYRE et al., 2001).

### **Consideração final**

Embora cada vez mais estudos acerca do papel do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial nas doenças hepáticas, especialmente a doença do fígado gorduroso não alcoólica, estejam disponíveis, ainda são necessários trabalhos que

comprovem tal relação, buscando contribuir cada vez mais para o entendimento de diversas desordens clínicas, ainda não totalmente elucidadas, possibilitando a adoção de medidas preventivas e/ou terapêuticas.

## Referências

1. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, et al. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of nonalcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut*. 2005;54: 987-93.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346: 1221-1231.
3. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. 2006;6(1):1–28.
4. Bhardwaj P, Madan K, Thareja S, Joshi YK, Saraya A. Comparative redox status in alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int*. 2008;2:202–208
5. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;967:7–18
6. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Jour Clin Investigation*. 2004;114(2):147-152.
7. Caldwell SH, Chang CY, Nakamoto RK, Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis*. 2004;8:595– 617.
8. Cheung O, Sanyal AJ. Abnormalities of Lipid Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sem liver Dis*. 2008;28(4):351-359.
9. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, et al. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002; 35:373-379.
10. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Sem liver Dis*. 2001;21:27-41.
11. Choi CS, Savage DB, Kulkarni A, et al. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2007;282(31): 22678–22688.
12. Clemens MG. Nitric oxide and liver injury. *Hepatology*. 1999;30:1-5.
13. Contos MJ, Sanyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol*. 2002;9:37-51.
14. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998; 114(4):842-845.

15. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2000;97:12222–12226.
16. Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukic L, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007;13(34):4539–455.
17. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology.* 2004;40:185-194.
18. Festi D, Colectchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev.* 2004; 5(1):27-42.
19. Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:1086–1093.
20. Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinário A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis associates with histological severity of liver disease. *J Hepatol.* 2000; 32:331-338.
21. Hassanein T. Mitochondrial dysfunction in liver disease and organ transplantation. *Mitochondrion.* 2004;4:609–620.
22. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2008;28(4):370-379.
23. Kim YW, Kim YM, Yang YM, Kim TH, Hwang SJ, et al. Inhibition of SREBP-1c-mediated hepatic steatosis and oxidative stress by sauchinone, an AMPK-activating lignan in *Saururus chinensis*. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:567–578
24. Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Fukui H, Morimoto H, Tamagawa Y. Mitochondrial abnormality and oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(S1):61S–66S.
25. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative Stress and Enzymatic Antioxidant Status in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci.* 2004; 34(1):57-62.
26. Kovacs P, Stumvoll M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(4):625–35.
27. Lackner C, Gogg-Kamerer M, Zatloukal K, Stumptner C, Brunt E, Den H. Ballooned hepatocytes in steatohepatitis: The value of keratin immunohistochemistry for diagnosis. *J Hepatol.* 2008;48(5):821-828.
28. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The Lysosomal-Mitochondrial Axis in Free Fatty Acid-Induced Hepatic Lipotoxicity. *Hepatology.* 2008;47(5):1495-1503.
29. Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Dattagupta S, Saraya A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(10):930–5.

30. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094–2099
31. Marchesini G, Forlani G. NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology*. 2002;35:497-499.
32. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev*. 2002;60:289-293.
33. Moriel P, Plavnik FL, Zanella MT, Bertolami MC, Abdalla DS. Lipid peroxidation and antioxidants in hyperlipidemia and hypertension. *Biol Res*. 2000;33(2):105–12.
34. Oliveira CPMS, Coelho AMM, Barbeiro HV, Lima VMR, Soriano F, Ribeiro C, et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(2) 189-194.
35. Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, et al. Increase in liver antioxidant enzyme activity in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2005;25(5):946–53.
36. Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001;21:57-69.
37. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol*. 2005; 42(6):928–40.
38. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C et al. A Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2007;46(4):1081-1090.
39. Rashid M, Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30:48–52.
40. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2001; 121:711–23.
41. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(5):447–455
42. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120:1183–1192.
43. Seki S, Kitada T, Sakaguchi H. Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatol Res*. 2005;33:132–134.
44. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2002;37(1):56-62.
45. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. 2002;277:44784–44790.
46. Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *new engl j med*. 2000;343:1467-1476.

47. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology*. 2006;147(2):943–951.
48. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E275–E281.
49. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48: 206-211.
50. Yamagishi S, Edelstein D, Du X, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem*. 2001;276:25096–25100.
51. Yang SQ, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, et al. Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 378: 259–268.

### **3 ARTIGO DE RESULTADOS**

*Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos à dieta cetogênica rica em trienantina*

## RESUMO

**Introdução:** A trienantina (triptanoína), um triacilglicerol de cadeia média do ácido heptanóico, com propriedade anaplerótica, se mostrou mais efetiva na reversão dos sintomas mais severos em portadores de desordens mitocondriais congênitas, que os tradicionais triacilgliceróis de cadeia média. O presente trabalho visou contribuir com a ampliação do conhecimento acerca da repercussão do consumo de trienantina, em proporções cetogênicas, através da avaliação da sua influência sobre o perfil em AG do tecido hepático de ratos. **Métodos:** Trinta ratos machos *wistar* foram divididos em três grupos ( $n=10$ ) e submetidos à dieta controle AIN-93, dieta cetogênica rica em trienantina ou dieta cetogênica rica em óleo de soja. Após o sacrifício, os fígados foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e posteriormente submetidos à extração lipídica por solvente orgânico e à metilação com  $\text{BF}_3$  em metanol a 20%, para a obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos, que foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Utilizaram-se os testes de Lilliefors e Levene, seguidos por ANOVA e *post-hoc* de Tukey, nos resíduos que atenderam os pressupostos paramétricos, e Kruskal-Wallis seguido pelo *post-hoc* de Nemenyi, para os demais. **Resultados:** Os fígados dos ratos dos grupos alimentados com dieta cetogênica apresentaram redução significativa na concentração dos ácidos graxos monoinsaturados 9-hexadecenóico e 9-octadecenóico, quando comparados ao grupo Controle, sugerindo uma possível redução na atividade da enzima Estearoil-CoA Dessaturase 1, responsável pela síntese desses dois ácidos graxos. Adicionalmente, o grupo alimentado com trienantina apresentou aumento dos níveis de ácido octadecanóico, quando comparado ao grupo Controle. **Conclusão:** As alterações no perfil em ácidos graxos dos lipídios hepáticos de ratos submetidos às dietas cetogênicas ricas em trienantina ou em óleo de soja, não pareceram guardar relação com a fonte de óleo da dieta, mas, sim, com as características da dieta cetogênica *per sí*. Tal consideração vem a se somar às evidências disponíveis na literatura de ausência de efeitos deletérios do consumo de trienantina, mesmo em proporções cetogênicas.

**Palavras-chave:** *triptanoína; triacilgliceróis de cadeia média, estearoil-CoA dessaturase.*

## ABSTRACT

**Introduction:** The trienantin (triheptanoin) is a medium chain triglyceride composed of heptanoic acid, with anaplerotic property, which has been shown to be more effective in reversing more severe symptoms in patients with congenital mitochondrial disorders than traditional medium chain triacylglycerols. This paper aims to contribute to the expansion of knowledge about the repercussions of consuming trienantin in ketogenic ratios by evaluating their influence on the fatty acid profile in rats liver tissue. **Methods:** Thirty male Wistar rats were divided into 3 groups (n = 10) and submitted to the AIN-93 control diet, ketogenic diet rich in trienantin or ketogenic diet rich in soybean oil. After sacrifice, livers were stored at -80 ° C and then subjected to lipid extraction by organic solvent and methylation with BF<sub>3</sub> in methanol (20%), to obtain methyl esters of fatty acids, which were then subjected to gas chromatography mass spectrometry. We used the Lilliefors and Levene tests, followed by ANOVA and Tukey's post hoc, for parametric means and Kruskal-Wallis followed by *post-hoc* Nemenyi for non-parametric means **Results:** The livers of mice fed a ketogenic diet in both groups showed a significant reduction in the concentration of monounsaturated fatty acids 9-hexadecenoic and 9-octadecenoic compared to control group, suggesting possibly a reduction in the activity of the enzyme Stearoil-CoA Desaturase 1, responsible for the synthesis of these two fatty acids. Additionally, the group fed trienantin showed increased levels of octadecanoic acid compared to control group. **Conclusion:** Changes in fatty acid profile of liver lipids of rats on ketogenic diets rich in trienantin or soybean oil, did not seem to be related to the source of oil in the diet, but rather with the characteristics of the ketogenic diet itself. Such consideration comes to be added to the available evidence in the literature of the absence of deleterious effects of consuming trienantin even in ketogenic ratios.

**Keywords:** *triheptanoin, medium-chain triacylglycerols, stearoil-CoA desaturase.*

## Introdução

O perfil lipídico da dieta determina a incorporação e a composição de ácidos graxos (AG) das membranas biológicas, alterando diversas funções celulares (CLANDININ et al., 1991; BUENO et al., 2010), inclusive de órgãos como o fígado e o tecido adiposo, através, principalmente, da modulação dos AG esterificados aos fosfolipídios de membrana (LIN et al., 1993; PAN e STORLIEN, 1993). Dentre as funções celulares dependentes do perfil lipídico das membranas encontram-se a sensibilidade à insulina (IBRAHIM; NATARAJAN; GHAFLOORUNISSA, 2005), a produção de eicosanóides e mensageiros secundários (KELLEY, 2001) e a atividade de enzimas ligadas à membrana (CLAMP et al., 1997). Modificações importantes no perfil em AG de um órgão considerado “a usina metabólica do organismo”, como o fígado, leva a crer que acarretem alterações metabólicas também importantes.

Dentre os lipídios, os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são compostos por três AG saturados, de seis a doze átomos de carbono, esterificados a uma molécula de glicerol. São rapidamente absorvidos no trato digestivo e metabolizados, diferentes de óleos e gorduras convencionais (LOPEZ-HERNANDEZ; GARCIA; HILL, 2005). Por esta razão, foram introduzidos na clínica, aproximadamente há meio século, para o tratamento de disfunções na absorção e no transporte linfático de lipídios, abetalipoproteinemia, estresse cirúrgico, câncer, desnutrição e outros, substituindo os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). Adicionalmente, têm sido usados como componentes de dietas cetogênicas no tratamento de epilepsia e de disfunções do metabolismo oxidativo mitocondrial (HILL et al., 1990; MAK; CHI; VAN, 1999; ROE et al., 2002).

Há mais de três décadas foram descritas desordens metabólicas decorrentes da deficiência hereditária da enzima Carnitina Palmitoil-Transferase 1 (CPT-1) (CORNELIO et al., 1977), que trouxeram à tona enfermidades que envolvem o funcionamento inadequado de diferentes etapas da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), caracterizadas por hipoglicemia, neuropatia periférica, hipotonia, cardiomiopatias agudas e crônicas, rbdomiólise e morte súbita (ROE et al., 2002). Tradicionalmente, nestas desordens utilizam-se TCM convencionais, que apresentam AG com número par de átomos de carbono; porém, essa terapêutica não foi suficiente para evitar os quadros de cardiomiopatia e rbdomiólise. A utilização de TCM constituído por AG com número ímpar de átomos de carbono, pouco freqüentes

na natureza, como a trienantina (Figura 1), por sua vez, foi mais efetiva (ROE et al., 2002).

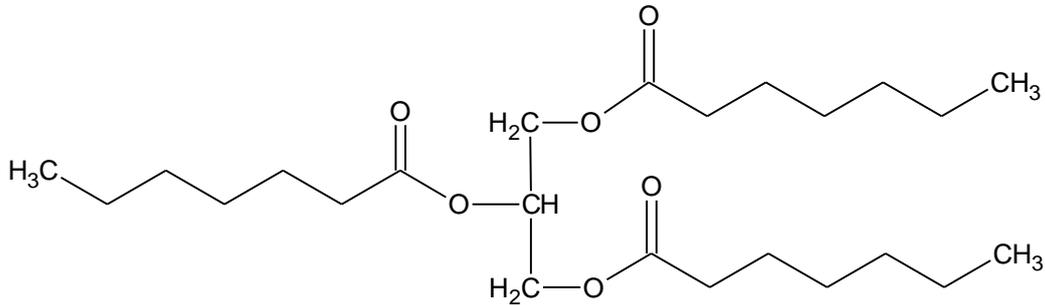


Figura 1 – Trienantina (triptanoína)

A trienantina é um TCM sintético composto por três moléculas de AG enântico (ácido heptanóico; C7:0). O ácido heptanóico prescinde de ligação à CPT-1 para atravessar a membrana mitocondrial interna e oferece, na última volta da  $\beta$ -oxidação, acetil-CoA e propionil-CoA (ROE et al., 2002). Este último é um composto anaplerótico, ou seja, participa de reações que alimentam o ciclo do ácido cítrico (OWEN, 2002), através da sua conversão metabólica ao succinil-CoA. Uma vez que alguns intermediários do ciclo são constantemente utilizados como precursores de vias biossintéticas (cataplerose), o balanço entre a anaplerose e a cataplerose nos portadores das desordens hereditárias da oxidação de AGCL está prejudicado. Portanto, a oferta de compostos anapleróticos faz-se necessária (ROE et al., 2002).

Especificamente em relação à trienantina e seus produtos de digestão, estudos acerca da segurança e tolerabilidade do consumo crônico são escassos, embora promissores. Há poucos relatos de ensaios clínicos, os quais se baseiam em crianças portadoras de desordens mitocondriais (MOCHEL et al., 2005; ROE et al., 2002; ROE e MOCHEL, 2006) e ensaios experimentais (ATAIDE et al., 2009; LUCENA et al., 2010).

Diante do exposto, faz-se necessário que se amplie o conhecimento acerca da repercussão da ingestão de trienantina, em diferentes contextos, sobre a saúde humana. O presente estudo visa contribuir com essa ampliação, através de uma avaliação da influência da trienantina dietética, em proporções cetogênicas, sobre o perfil em AG do tecido hepático de ratos.

## Material e Métodos

### **Animais**

Os animais empregados nesta pesquisa foram os mesmos utilizados no trabalho de Lucena et al. (2010), que objetivou avaliar os efeitos metabólicos de uma dieta rica em lipídios à base de trienantina, em ratos jovens. Trinta ratos machos albinos recém desmamados, da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, pesando  $33.4 \pm 5.7$  g (média  $\pm$  DP), foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN/UFAL). Os animais foram mantidos sob temperatura de 20-24°C e ciclo claro escuro de 12 horas (luz acesa às 6h) e foram alocados, individualmente, em gaiolas metabólicas no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição/UFAL. Os animais receberam dieta e água *ad libitum*, por seis semanas, além do período de adaptação de uma semana. O peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente, durante todo o período experimental.

O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFAL, sob direção do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, que se baseia em princípios nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979) e internacionais (Universal Declaration of Animal Rights UNESCO, 15/10/1978).

### **Dietas e tratamentos**

Os animais foram distribuídos, de acordo com o peso corporal no início do período experimental e com a dieta oferecida, em três diferentes grupos ( $n=10$ ): Controle (dieta AIN-93G; 7g de óleo de soja/100g dieta) (REEVES, 1997), CetoTAGC<sub>7</sub> (dieta cetogênica à base de trienantina; 40g de margarina, 4g de óleo de soja e 25,79g trienantina/100g de dieta) e CetoTAGsoja (dieta cetogênica à base de óleo de soja; 40g de margarina e 29,79 g de óleo de soja/100g de dieta) (Quadro 1). A proporção de macronutrientes na dieta controle era de 1:11,8 de lipídios para carboidratos + proteínas, respectivamente, enquanto que nas dietas cetogênicas era de 3,5:1. A margarina foi utilizada para melhorar a consistência e promover homogeneidade das dietas.

Os ingredientes utilizados na preparação das dietas foram fornecidos por Rhoister (São Paulo, Brasil). A trienantina foi adquirida de *stéarinerie Dubois* (Boulogne-

Billancourt, France). A margarina, o óleo de soja e o amido de milho foram adquiridos do comércio local.

Quadro 1. Composição das dietas controle, cetoTAGC<sub>7</sub> e cetoTAGsoja

Constituintes (g/kg)	Dietas		
	controle*	cetoTAGC <sub>7</sub>	cetoTAGsoja
Amido de milho	495,9	0	0
Amido de milho dextrinizado	132,0	0	0
Caseína	200	200	200
Celulose	50	50	50
Mix mineral AIN-93 G	35	35	35
Mix vitamina AIN-93	10	10	10
L-cisteína	3	3	3
L-metionina	1,6	1,6	1,6
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
†-Butilidroquinona (mg/kg)	14	139,58	139,58
Óleo de soja	70	40	297,9
Trienantina	0	257,9	0
Margarina	0	400	400
Energia (Kcal/Kg)**	3.941,6	7.003,7	7.081,1

\*Reeves et al., 1997.

\*\*Estimada conforme Atwater e Bryant (1900).

### ***Análise do perfil em ácidos graxos das dietas e do tecido hepático***

#### ***Extração da fração lipídica***

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com uma injeção de uretana+cloralose (1000mg/kg+40mg/kg) e sacrificados por deslocamento cervical. Na sequência, procedeu-se à dissecação de órgãos, que foram armazenados em freezer a -80°C. Para a presente proposta de investigação, promoveu-se extração lipídica do tecido hepático, de acordo com o método de Folch et al. (1957), em que as amostras, 1g de cada, foram maceradas em cápsula de porcelana e homogeneizadas em 1,25 mL de tampão fosfato de sódio, pH 7,2. Em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de clorofórmio/metanol, na proporção 2:1, 0,3mg do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) e o homogenato. A mistura foi levada ao agitador de tubos, por 1 minuto, e ao agitador rotatório, por 4 h, e, em seguida, mantida sob refrigeração, durante a noite (*overnight*). No dia seguinte, foi acrescentado 1 mL de

NaCl a 0,9%, agitando-se novamente em agitador de tubos, por 1 minuto. Após a separação das fases, tomou-se a inferior, clorofórmica, e a superior foi lavada com mais 2 mL de clorofórmio. As frações clorofórmicas foram reunidas e secadas com sulfato de sódio anidro e filtradas. Após a evaporação do solvente sob atmosfera de nitrogênio gasoso, o material foi submetido à metilação. As dietas não foram submetidas a esta etapa, uma vez que foram consideradas apenas amostras de suas fontes lipídicas, nas proporções determinadas.

### ***Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos***

Os extratos lipídicos do tecido hepático, obtidos na etapa de extração descrita no item anterior, e as amostras dos lipídios dietéticos foram submetidos à metilação com trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3$ ) em metanol, conforme procedimento descrito por Kang e Wang (2005), com adaptações. No tubo de ensaio contendo o material a ser metilado, foram adicionados 1mL de hexano e 1mL de  $\text{BF}_3$  em metanol a 20%. A mistura foi colocada em uma placa de aquecimento e agitação à temperatura aproximada de  $40^\circ\text{C}$ , por 30 horas, em cinco dias consecutivos, de seis horas cada. Ao final das 30 horas, adicionou-se 1mL de água destilada, que gerou duas fases, a superior, orgânica, que continha os ésteres metílicos de AG, foi colocada em outro tubo, secada em nitrogênio gasoso e armazenada à  $-20^\circ\text{C}$ , para análise cromatográfica. A fase inferior, contendo  $\text{BF}_3$  e metanol, diluídos em água, foi descartada.

### ***Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CGEM)***

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Um  $\mu\text{L}$  da amostra foi injetado utilizando-se um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna SPB-5, série us 108447-08B, com 30m de comprimento,  $0,25\mu\text{m}$  de espessura e  $0,25\text{mm}$  de diâmetro interno. O gás utilizado para o arraste foi o Hélio (He), a um fluxo de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e pressão de 50 kPa. A temperatura inicial foi de  $50^\circ\text{C}$ , permanecendo constante durante 2 minutos; em seguida, foi aumentada até atingir  $250^\circ\text{C}$ , a uma velocidade de  $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , permanecendo constante durante 15 minutos. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a  $250^\circ\text{C}$  e  $310^\circ\text{C}$ , respectivamente. O modo de controle de injeção foi o *Split*, com razão de 30:1. A espectrometria de massas foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A, acoplado ao cromatógrafo gasoso, com 70 eV de energia do feixe de

elétrons. Foi adotada a porcentagem de área dos picos cromatográficos para a quantificação dos ácidos graxos nas amostras (Apêndices 1 a 6).

### **Análise estatística**

Para a análise estatística, foram considerados os pressupostos paramétricos de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Levene). Foi realizada ANOVA com teste *post-hoc* de Tukey ou, na ausência de homogeneidade nas variâncias dos resíduos, o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Nemenyi. Em todos os casos foi adotado o nível crítico de 5% para o risco de falsa rejeição da hipótese nula ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados**

Os ácidos graxos encontrados nos tecidos hepáticos dos animais foram dodecanóico, tetradecanóico, pentadecanóico, 9-hexadecenóico, octadecanóico, 9-octadecenóico, 9,12-octadecadienóico e 9,12,15-octadecatrienóico, cujas concentrações apresentaram homogeneidade das variâncias dos resíduos, e hexadecanóico, heptadecanóico e 5,8,11,14-eicosatetraenóico, com heterogeneidade das variâncias (Tabela 1). O perfil em ácidos graxos das dietas fornecidas aos animais dos diferentes grupos encontra-se na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais em relação aos ácidos dodecanóico, heptadecanóico, 9,12,15-octadecatrienóico e 5,8,11,14,-eicosatetraenóico. Em contrapartida, observaram-se diferenças significativas entre os grupos Controle e cetogênicos e entre os próprios grupos cetogênicos, no que diz respeito aos ácidos tetradecanóico, pentadecanóico, hexadecanóico, 9-hexadecenóico, octadecanóico, 9-octadecenóico e 9,12-octadecadienóico (Tabela 1).

Dentre os resultados observados, destacam-se as concentrações significativamente maiores dos ácidos graxos hexadecanóico, 9-hexadecenóico e 9-octadecenóico no fígado dos animais do grupo Controle, em relação ao grupo CetoTAGsoja, e a maior concentração do ácido octadecanóico no fígado dos ratos sob dieta cetogênica à base de trienantina, do que nos animais submetidos à dieta controle (Tabela 1). Destacam-se, ainda, as diferenças de concentração do ácido 9,12-octadecadienóico entre os grupos Controle e CetoTAGsoja e entre os grupos

cetogênicos ( $p < 0,001$ ), bem como entre os grupos Controle e CetoTAGC<sub>7</sub>, no que diz respeito aos ácidos, 9-hexadecenóico, 9-octadecenóico e octadecanóico ( $p < 0,01$ ).

**Tabela 1.** Escores médios percentuais de diferentes ácidos graxos do tecido hepático dos ratos submetidos às dietas controle, cetoTAGC<sub>7</sub> e cetoTAGsoja.

Ácidos Graxos (%; média ± EPM)	Grupos		
	Controle (n=7)	CetoTAGC <sub>7</sub> (n=9)	CetoTAGsoja (n=7)
Dodecanóico	0,0329 ± 0,0145	0,1556 ± 0,0671	0,0871 ± 0,0331
Tetradecanóico	0,9357 ± 0,1389	0,5233 ± 0,1470	0,2500 ± 0,0578 <sup>a</sup>
Pentadecanóico	0,0970 ± 0,0339	0,1640 ± 0,0341	0,0330 ± 0,0164 <sup>b</sup>
Hexadecanóico	36,3686 ± 4,1831	26,8300 ± 2,4167	20,5914 ± 1,0524 <sup>c</sup>
Heptadecanóico	0,1043 ± 0,0464	0,2056 ± 0,0565	0,0414 ± 0,0201
Octadecanóico	13,2286 ± 1,7042	29,1144 ± 4,3476 <sup>a</sup>	20,6071 ± 2,8860
9-hexadecenóico	3,9886 ± 0,4760	0,2878 ± 0,2030 <sup>a</sup>	0,0743 ± 0,0356 <sup>a</sup>
9-octadecenóico	23,2110 ± 2,2952	12,239 ± 1,8884 <sup>a</sup>	12,8490 ± 0,8957 <sup>a</sup>
9,12-octadecadienóico	14,2529 ± 0,4473	14,6489 ± 2,4285	34,8814 ± 2,4861 <sup>a,b</sup>
9,12,15-octadecatrienóico	0,1443 ± 0,0691	0,0822 ± 0,0532	0,2357 ± 0,0691
5,8,11,14-eicosatetraenóico	7,2643 ± 2,9659	15,2378 ± 4,5650	10,1000 ± 1,3947
ΣSaturados	8,4611 ± 2,2009	11,6179 ± 1,9624	6,9350 ± 1,5835
ΣMonoinsaturados	13,6000 ± 2,8938	6,2633 ± 1,7173 <sup>a</sup>	6,4614 ± 1,8231 <sup>a</sup>
ΣPoliinsaturados	7,2204 ± 1,7714	9,9896 ± 2,1523	15,0723 ± 3,3814

<sup>a</sup> diferenças significativas em relação ao grupo Controle pelo teste *post-hoc* de Tukey-HSD ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> diferenças significativas em relação ao grupo CetoTAGC<sub>7</sub> pelo teste *post-hoc* de Tukey-HSD ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> diferenças significativas em relação ao grupo Controle pelo teste *post-hoc* de Nemenyi ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores percentuais aproximados dos ácidos graxos mais abundantes nas dietas oferecidas aos animais dos grupos Controle, CetoTAGC<sub>7</sub> e CetoTAGsoja.

Ácidos graxos (%)	Dietas		
	controle	cetoTAGC <sub>7</sub>	cetoTAGsoja
Heptanóico	ND	96,21	ND
Dodecanóico	ND	0,81	1,64
Hexadecanóico	24,18	0,62	14,29
9,12-octadecadienóico	39,21	0,69	54,79
9-octadecenóico	32,33	0,71	21,89
Octadecanóico	4,41	0,95	7,40

**ND** Não detectado.

## Discussão

A composição em ácidos graxos da dieta é conhecida por influenciar a composição em ácidos graxos de lipídios estruturais e de estoque, em diferentes compartimentos corporais (ANDERSSON et al. 2001). Mudanças na composição em ácidos graxos da dieta podem exercer diferentes efeitos sobre a composição em ácidos graxos dos lipídios de membrana. Os fosfolipídios de tecidos como o fígado e o intestino grosso são os mais sensíveis às mudanças proporcionadas pela dieta, enquanto fosfolipídios de timócitos e do tecido adiposo são menos responsivos (HULBERT et al., 2005).

O principal achado da presente investigação foram os níveis significativamente menores dos ácidos graxos monoinsaturados 9-hexadecenóico e 9-octadecenóico apresentados pelos grupos CetoTAGsoja e CetoTAGC<sub>7</sub>, quando comparados ao grupo Controle (Tabela 1). A síntese destes ácidos graxos é catalisada pela enzima estearoil-CoA dessaturase 1 (*Stearoil-CoA Desaturase 1*; SCD1), que tem como substratos fundamentais os ácidos hexadecanóico e octadecanóico, respectivamente. A atividade dessa enzima é imprescindível para a síntese hepática de triacilgliceróis, devido à necessidade de incorporação de um ácido graxo monoinsaturado em um dos carbonos do glicerol (ALLARD et al., 2008; NTAMBI e MYIAZAKI, 2004). Sua expressão é sensível a fatores dietéticos, incluindo ácidos graxos poliinsaturados, colesterol e vitamina A, teor hepático de ácidos graxos *trans*, mudanças hormonais (insulina e glucagon) e obesidade (LARQUE et al., 2000; NAKAMURA e NARA, 2002; WANG et al., 2006; NTAMBI, 1995).

Uma possibilidade que poderia ser considerada nesse contexto seria a de que as dietas cetogênicas exerceram uma diminuição na atividade da enzima SCD1, levando a uma menor concentração de ambos os ácidos graxos monoinsaturados nos grupos a elas submetidos (Tabela 1). Em camundongos, a deficiência da SCD1 induz perda de massa corporal, através da maior oxidação hepática de ácidos graxos e da menor síntese e armazenamento de triacilgliceróis, por meio da diminuição da expressão de genes lipogênicos. Esses animais se tornam mais sensíveis à ação da insulina e resistentes à obesidade induzida pela dieta (NTAMBI et al., 2002). São muitos os relatos na literatura de animais submetidos à dieta cetogênica ou *high-fat*, que ganharam menos peso do que aqueles submetidos à dieta regular (LAVAU e

HASHIM, 1978; ZHAO et al., 2004; HAN et al., 2003). Lucena et al. (2010), utilizando-se do presente protocolo, verificaram um ganho de peso significativamente menor nos ratos submetidos à dieta cetogênica, em relação ao grupo Controle, na segunda, terceira e quarta semanas do estudo; no entanto, tal diferença desapareceu na última semana do período experimental.

A concepção da dieta cetogênica, iniciada em meados de 1920, já indicava que ela mimetiza as mudanças bioquímicas do jejum (VINING et al., 1998). Este se caracteriza por intensa oxidação de ácidos graxos e diminuição da lipogênese, para a obtenção de energia (SANKAR e MENEZES, 1999). Nesse sentido, supõe-se que o menor ganho de peso de animais submetidos à dieta cetogênica poderia ser relacionado, em parte, a uma redução da atividade da SCD1, que acarreta menor produção de triacilgliceróis, uma vez que estes necessitam de ácidos graxos monoinsaturados para a sua síntese.

Na presente investigação, o ácido graxo tetradecanóico apresentou baixas concentrações nos três grupos estudados, havendo diferença significativa entre o grupo CetoTAGsoja e Controle (Tabela 1). Estes dados estão em consonância com outros estudos, que também encontraram baixas concentrações desse ácido graxo (CLAMP et al., 1997; SABARENSE, 2003; TAHA; RYAN; CUNNANE, 2005), o que leva a crer que haja uma forte regulação intracelular de sua concentração (RIOUX; CATHELINE; LEGRAND, 2007). Em hepatócitos de ratos, há vias alternativas para a biossíntese de ácido tetradecanóico, além da via usual de biossíntese de AG por meio da ácido graxo sintase, que libera, principalmente, ácido hexadecanóico. Uma dessas vias é o encurtamento do hexadecanoato pela  $\beta$ -oxidação microssomal ou a elongação do dodecanoato (RIOUX; CATHELINE; LEGRAND, 2007). No entanto, o tetradecanoato também é preferencialmente oxidado, via  $\beta$ -oxidação, ou alongado, o que resulta em hexadecanoato, e gera um ciclo que parece contribuir para os baixos níveis deste ácido graxo no tecido hepático de ratos (RIOUX; LEMARCHAL; LEGRAND, 2000).

O ácido graxo pentadecanóico dos fígados dos animais do grupo CetoTAGsoja mostrou-se significativamente menor do que no grupo CetoTAGC<sub>7</sub>. O papel deste ácido graxo no metabolismo animal não está bem estabelecido. Existem evidências de que a forma ativada do ácido pentadecanóico, pentadecanoil-CoA, é tão efetiva quanto o miristoil-CoA na acilação de proteínas que sofrem N-miristoilação. Porém, esse papel provavelmente é secundário, devido às ínfimas concentrações de ácido

pentadecanóico nos tecidos (JOHNSON et al., 1994). Estudos relacionam a sua presença com o consumo de gordura de laticínios (GERMAN e DILLARD, 2004; SMEDMAN et al., 1999), ausente na dieta dos animais aqui investigados, fato que poderia justificar a pequena quantidade encontrada nos tecidos.

Os fígados dos animais do grupo CetoTAGsoja apresentaram concentrações significativamente maiores do ácido graxo poliinsaturado 9,12-octadecadienóico, quando comparados com os demais grupos (Tabela 1). A dieta ofertada a estes animais possuía aproximadamente quatro vezes mais óleo de soja, importante fonte deste ácido graxo, do que a dieta ofertada ao grupo Controle, e aproximadamente sete vezes mais que a dieta cetotAGC<sub>7</sub>. Uma vez que o ácido 9,12-octadecadienóico não é sintetizado endogenamente, sua concentração no tecido hepático deve ser reflexo do teor dietético, aqui demonstrado pela expressiva predominância deste ácido graxo na dieta ofertada ao grupo CetoTAGsoja (Tabela 2).

Observaram-se menor concentração do ácido hexadecanóico no grupo CetoTAGsoja, quando comparado ao grupo Controle, e, surpreendentemente, ausência de diferenças significativas entre os grupos CetotAGC<sub>7</sub> e Controle e entre os grupos cetogênicos entre si, apesar das diferentes composições em ácido hexadecanóico das dietas (Tabelas 1 e 2). A dieta ofertada aos animais do grupo CetoTAGsoja continha menor quantidade desse ácido graxo do que a dieta controle e quantidade muito maior do que aquela encontrada na dieta do grupo CetotAGC<sub>7</sub> (Tabela 2). No entanto, diferentemente de ácidos graxos essenciais, o hexadecanoato é sintetizado endogenamente, sendo o principal produto do complexo da ácido graxo sintase, que utiliza como substrato o acetil-CoA, proveniente de diferentes fontes, como glicose, lactato e aminoácidos, o que torna a modulação da sua síntese um processo de difícil investigação.

O grupo CetotAGC<sub>7</sub> apresentou quantidades significativamente maiores de ácido octadecanóico, quando comparado com o grupo Controle (Tabela 1). Sob condições normais, este ácido sofre rápida metabolização através da SCD1 e se converte em ácido 9-octadecenóico (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Reafirmando considerações já apresentadas, uma menor atividade da SCD1, promovida pela dieta cetogênica, poderia relacionar-se aos níveis aumentados de ácido octadecanóico nos fígados do grupo CetotAGC<sub>7</sub>. No entanto, os níveis deste ácido no grupo CetoTAGsoja não diferiram significativamente daqueles do grupo Controle.

## Conclusão

Observou-se que as alterações no perfil em ácidos graxos dos lipídios hepáticos de ratos submetidos às dietas cetogênicas ricas em trienantina ou em óleo de soja, um óleo convencional amplamente utilizado, não pareceram guardar relação com a fonte de óleo empregada na elaboração destas dietas, mas, sim, com as características da dieta cetogênica *per se*, apesar das diferenças na composição em ácidos graxos entre a trienantina e o óleo de soja. Tal consideração vem a se somar às evidências disponíveis na literatura de ausência de efeitos deletérios do consumo de trienantina, mesmo em proporções cetogênicas.

## Referências

1. Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *J Hepatol.* 2008;48(2):300-7.
2. Andersson A, Nälsén C, Tengblad S, Vessby B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr.* 2001;76(6):1222-9.
3. Ataíde TR, Oliveira SL, Da Silva FM, Vitorino Silva LGC, Tavares MCN, Sant'Ana AEG et al. Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoïn and triheptanoïn in rats. *Int J Food Sci and Tech.* 2009;44:484-92.
4. Atwater WO, Bryant AP. Dietary studies of university boat crews. USDA Office of Experiment Stations Bulletin 75. Government Printing Office, Washington, DC. 1900.
5. Bueno NB, Silva MAF, Melo ISV, Ataíde TR, Oliveira SL, Sant'Ana AEG. Perfil em ácidos graxos hepáticos de ratos com esteatose induzida pela dieta AIN-93 atenuada pela substituição parcial do óleo de soja por dieptanoína e trieptanoína. *Arq Bras Endocrinol Metab,* 2010;54(6):584-7.
6. Clamp AG, Ladha S, Clark DC, Grimble RF, Lund EK. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids.* 1997;32(2):179-84.
7. Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, CLandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *Faseb J.* 1991;5:2761-69.
8. Cornelio F, Di Donato S, Peluchetti D, Bize A, Bertagnolio B, D'Angelo A et al. Fatal cases of lipid storage myopathy with carnitine deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1977;40:170-8.
9. Folch JS, Lees M, Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1957;226:497–507.

10. German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr.* 2004;80:550-9.
11. Han J, Hamilton JÁ, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res.* 2003;11:734–744.
12. Hill JO, Peters JC, Swift LL, Yang D, Sharp T, Abumrad N et al. Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides. *J Lipid Res.* 1990;31:407–16.
13. Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev.* 2005;80:155–169.
14. Ibrahim A, Natarajan S, Ghafoorunissa R. Dietary trans–fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. *Metab Clin Exp.* 2005;54:240-6.
15. Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ. Genetic and biochemical studies of protein n-myristoylation. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:869-914.
16. Kang JX, Wang J. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *Biochemistry.* 2005;6:5
17. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition.* 2001;17(7/8):669-73.
18. Larque E, Perez-Llamas F, Puerta V, Giron MD, Suarez MD, Zamora S, et al. Dietary trans fatty acids affect docosahexaenoic acid concentrations in plasma and liver but not brain of pregnant and fetal rats. *Pediatr Res.* 2000;47:278–283.
19. Lavau MM, Hashim SA. Effect of medium chain triglyceride on lipogenesis and body fat in the rat. *J Nutr.* 1978;108:613–620.
20. Lin DS, Connor WE, Spenler CW. Are dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids deposited to the same extent in adipose tissue of rabbits? *Am J Clin Nutr.* 1993;58:174-9.
21. Lopez-Hernandez A, Garcia HS, Hill CG. Lipase-catalyzed Transesterification of Medium-chain Triacylglycerols and a Fully Hydrogenated Soybean Oil. *J Food Sci.* 2005;70(6):365-72.
22. Lucena ALM, Oliveira SL, Ataíde TR, Silva AX, Cabral Jr. CR, Oliveira MAR, et al. High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010;112(2):166-72.
23. Mak SC, Chi CS, Wan CJ. Clinical experience of ketogenic diet on children with refractory epilepsy. *Acta PaediatricaTaiwan.* 1999;40:97–100.
24. Mochel F, Delonlay P, Touat G, Brunengraber H, Kinamn RP, Rabier D, Roe C et al. Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab.* 2005;84(4):305-12.
25. Nakamura MT, Nara TY. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:1076–1079.
26. Ntambi JM. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res.* 1995;34:139-150.

27. Ntambi JM, Choi Y, Park Y, Peters JM, Pariza MW. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) on immune responses, body composition and Stearoyl-CoA Desaturase. *Can J Appl Physiol*. 2002;27:617–628.
28. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*. 2004;43(2):91-104.
29. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30409-12.
30. Pan DA, Storlien LH. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr*. 1993;123(3):512-9.
31. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*. 1997;127(5):838S–841S.
32. Rioux V, Catheline D, Legrand P. In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic acid shortening and lauric acid elongation. *Animal*. 2007;1(6)820-6.
33. Rioux V, Lemarchal P, Legrand P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. *J Nutr Biochem*, 2000;11:198-207.
34. Roe CR, Mochel F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: Therapeutic potential. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:332-40.
35. Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F, Brunengraber H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest*. 2002;110(2):259-69.
36. Sabarense CM. Avaliação do efeito dos ácidos graxos trans sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais. Tese de Doutorado. São Paulo, 2003.
37. Sampath H, Ntambi JM. The fate and intermediary metabolism of stearic acid. *Lipids*, 2005;40(12).
38. Sankar R, Menezes MS. Metabolic and endocrine aspects of the ketogenic diet *Epilepsy Res*. 1999;37(3):191-201
39. Smedman EM, Gustafsson IB, Berglund GT, Vessby BOH. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:22-9.
40. Taha AY, Ryan MA, Cunnane SC. Despite transient ketosis, the classic high-fat ketogenic diet induces marked changes in fatty acid metabolism in rats. *Metab Clin Exp*. 2005;54:1127-32.
41. Vining EP, Freeman JM, Ballaban-Gil K, Camfield CS, Camfield PR, Holmes GL, Shinnar S, Shuman R, Trevathan E, Wheless JW. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch Neurol*. 1998;55(11):1433-7.
42. Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res*. 2006;47:2028–2041.
43. Zhao Q, Stafstrom CE, Fu DD, Hu Y, Holmes GL. Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. *Pediatr Res*. 2004;55(3):498-506.

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A investigação da repercussão da dieta sobre o perfil em ácidos graxos dos lipídios hepáticos se apresenta como uma importante estratégia para a avaliação da segurança e tolerabilidade do consumo de determinados componentes dietéticos, especialmente a fração lipídica, partindo da premissa de que cada ácido graxo é uma entidade única, com funções próprias. Alterações na concentração dessas notórias moléculas sinalizadoras, num tecido que ocupa um papel central no metabolismo de mamíferos, como o fígado, são um importante achado, que deve ser discutido no contexto metabólico.

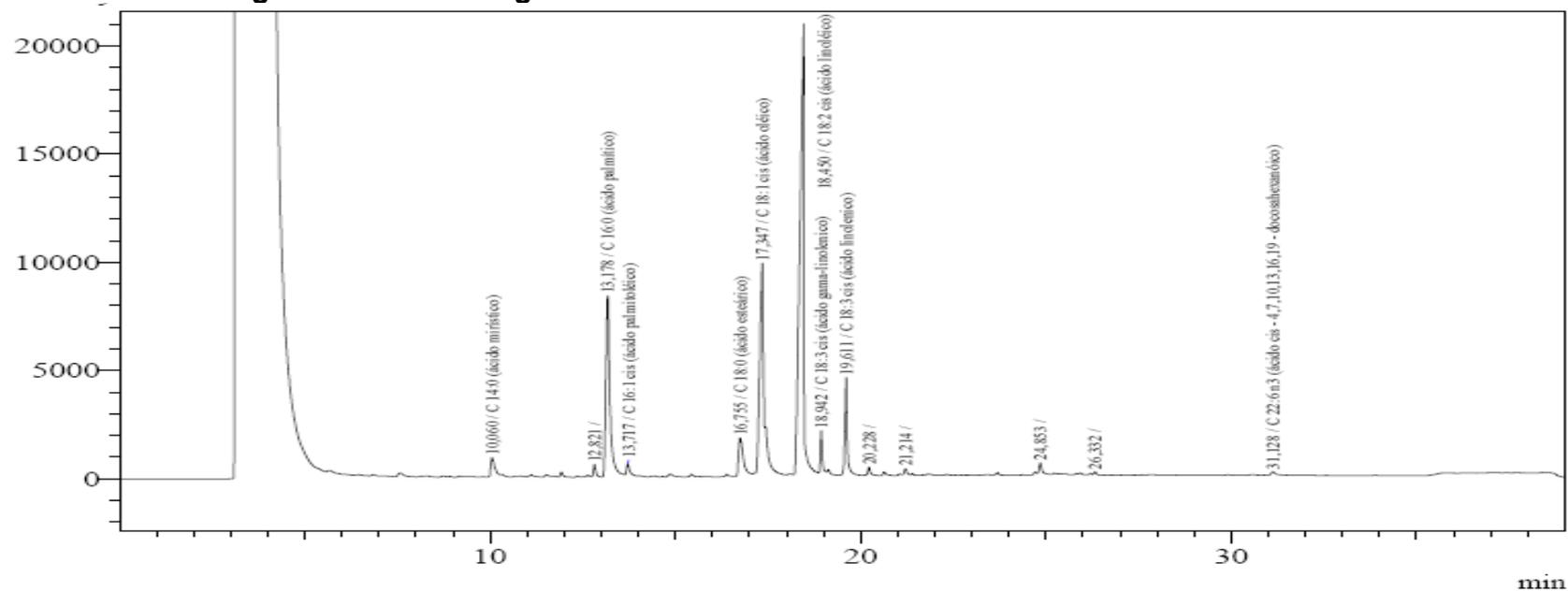
As alterações no perfil em AG dos lipídios hepáticos dos ratos submetidos às dietas cetogênicas, no presente estudo, provavelmente estão relacionadas à natureza das dietas e não ao tipo de óleo oferecido. Nesse sentido, parece seguro o uso da trienantina, quando comparado ao óleo de soja. Assim, esse estudo deve ser considerado como mais um indicador da segurança e tolerabilidade desse triacilglicerol, mesmo em proporções cetogênicas. No entanto, ainda são necessárias novas investigações científicas com o uso da trienantina, como participante do tratamento dietético, em diferentes contextos clínicos, combinada a outros componentes da dieta.

## 5. REFERÊNCIAS

- 1 Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. *Journal of Hepatology*. 2008;48(2):300-7.
- 2 Alwayn IP, Gura K, Nose V, Zausche B, Javid P, Garza J, et al. Omega-3 fatty acid supplementation prevents hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res*. 2005;57:445–452.
- 3 Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n6/n3 ratio in relation to hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci*. 2004;106:635–643.
- 4 Arendt BM, Mohammed SS, Aghdassi E, Prayitno NR, Ma DWL, Nguyen A, Guindi M, et al. Hepatic Fatty Acid Composition Differs between Chronic Hepatitis C Patients with and without Steatosis. *J Nutr*. 2009;139(4):691-695.
- 5 German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr*. 2004;80:550-9.
- 6 Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev*. 2005;80:155–69.
- 7 Levy JR, Clore JN, Stevens W. Dietary n \_ 3 polyunsaturated fatty acids decrease hepatic triglycerides in Fischer 344 rats. *Hepatology* 2004;39:608.
- 8 Lucena ALM, Oliveira SL, Ataíde TR, Silva AX, Cabral Jr. CR, Oliveira MAR, et al. High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2010;112(2):166-72.

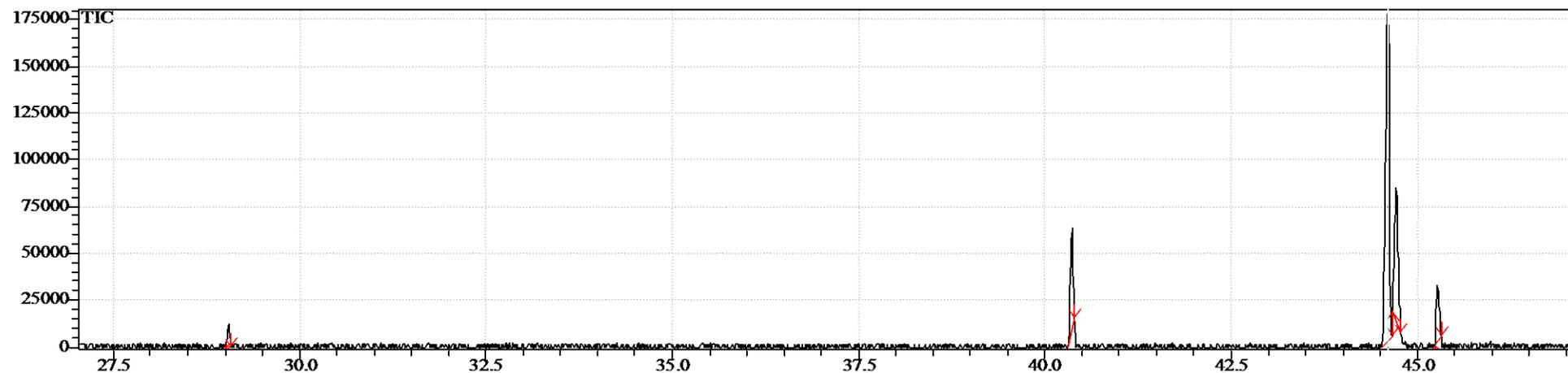


### Apêndice 1 – Cromatograma dos ácidos graxos da dieta controle



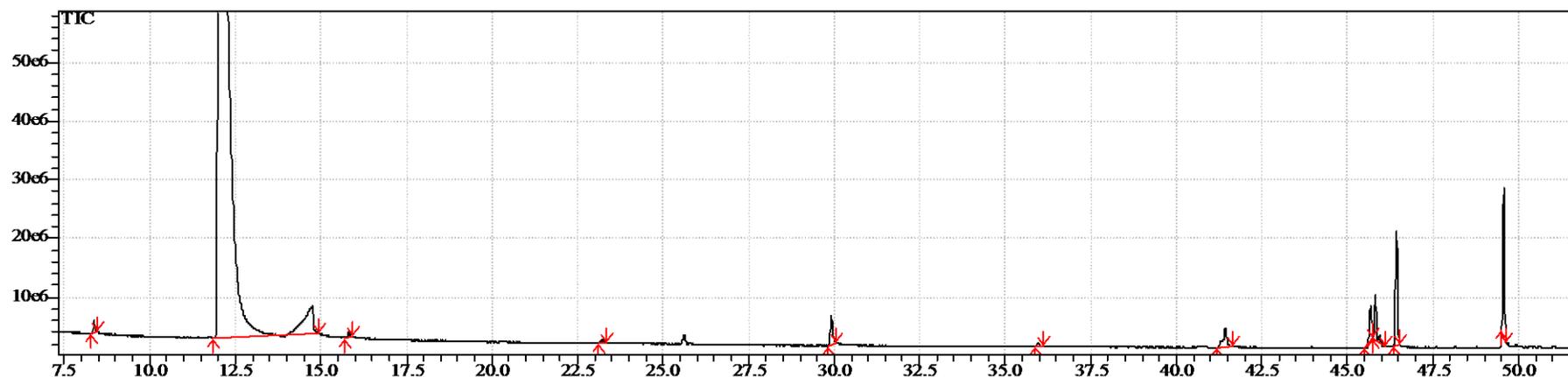
Tempo de retenção	Área	%Área	Ácido graxo
10060	8147	2.0278	Tetradecanoico
13178	65575	16.3215	Hexadecanoico
13717	2831	0.7046	9-hexadecenoico
16755	17059	4.2460	Octadecanoico
17347	88617	22.0566	9-octadecenoico
18.450	169837	42.2719	9,12-octadecadienoico
18.942	8562	2.1310	6,9,12-octadecatrienoico
19.611	22512	5.6031	9,12,15-octadecatrienoico
31.128	2099	0.5224	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico

## Apêndice 2 – Cromatograma dos ácidos graxos da dieta cetoTAGsoja



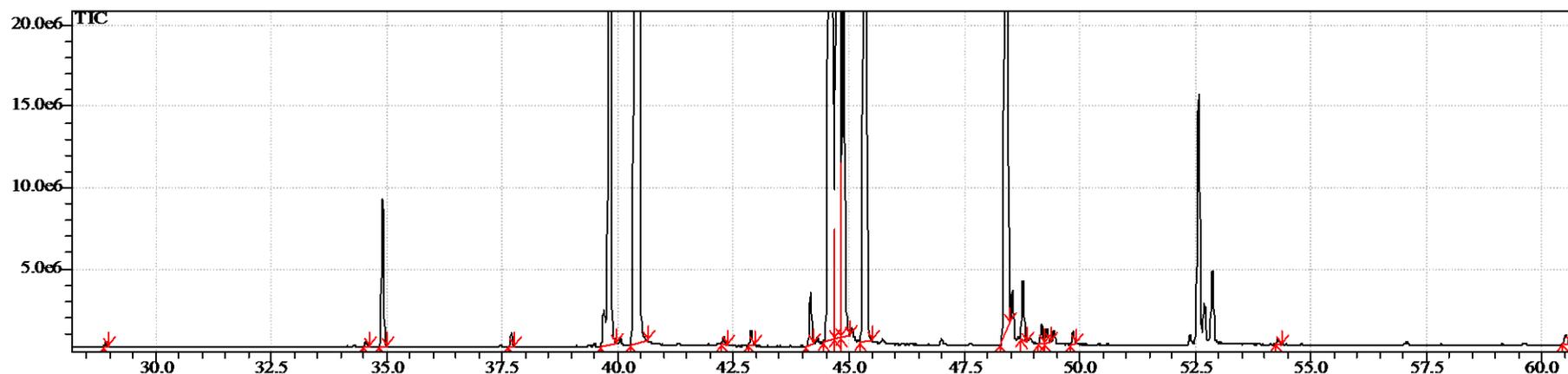
Tempo de retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área	%Área	Altura	%Altura	Área/Altura	Ácido graxo
29.042	29.008	29.075	21014	1.88	11492	3.29	1.83	Dodecanóico
40.367	40.317	40.400	143040	12.79	54921	15.72	2.60	Hexadecanóico
44.600	44.525	44.658	630621	56.36	182199	52.17	3.46	9,12-Octadecadienóico
44.717	44.667	44.783	239723	21.43	71080	20.35	3.37	9-octadecenóico
45.283	45.233	45.317	84305	7.54	29595	8.47	2.85	Octadecanóico

### Apêndice 3 – Cromatograma dos ácidos graxos da dieta cetoTAGC<sub>7</sub>



Tempo de retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área	%Área	Altura	%Altura	Área/Altura	Ácido graxo
8.375	8.267	8.483	7087464	0.21	2170734	0.92	3.27	Hexanóico
12.258	11.842	14.925	3050396814	91.30	164193996	69.78	18.58	Heptanóico
23.208	23.117	23.350	2491799	0.07	530290	0.23	4.70	Decanóico
29.917	29.800	30.075	22978653	0.69	4972830	2.11	4.62	Dodecanóico
35.975	35.858	36.092	2915788	0.09	627521	0.27	4.65	Tetradecanóico
41.442	41.175	41.658	23283593	0.70	3242323	1.38	7.18	Hexadecanóico
45.675	45.492	45.733	23174676	0.69	5798141	2.46	4.00	9,12-Octadecadienóico
45.817	45.742	46.083	38517068	1.15	7984502	3.39	4.82	9-octadecenóico
46.442	46.350	46.550	79261504	2.37	19507959	8.29	4.06	Octadecanóico
49.564	49.500	49.633	87422170	2.62	25339333	10.77	3.45	5,8,11,14-eicosatetraenóico

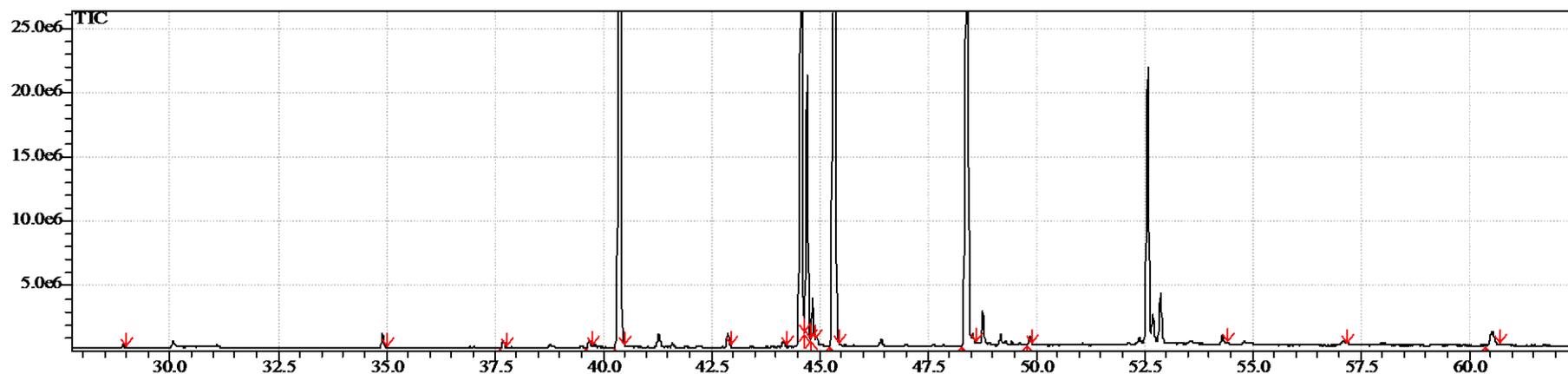
#### Apêndice 4 – Cromatograma dos ácidos graxos do fígado de rato do grupo Controle



Tempo de retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área	%Área	Altura	%Altura	Área/Altura	Ácido graxo
28.916	28.867	28.983	917213	0.03	312300	0.05	2.93	Dodecanóico
34.552	34.492	34.625	1171885	0.04	374153	0.06	3.13	Miristoléico
34.915	34.833	35.008	28029534	0.99	9124907	1.52	3.07	Tetradecanóico
37.695	37.625	37.775	2912930	0.10	912433	0.15	3.19	Pentadecanóico
39.833	39.617	39.967	158110159	5.58	42028963	6.99	3.76	9-hexadecenóico
40.452	40.267	40.650	652433117	23.03	108183341	18.00	6.03	Hexadecanóico
42.881	42.817	42.950	2988161	0.11	950305	0.16	3.14	Pentadecanóico
44.166	44.083	44.250	10455848	0.37	3282906	0.55	3.18	9,12,15-octadetrienoico
44.640	44.442	44.683	591573768	20.88	114921978	19.12	5.14	9,12-Octadecadienoico
44.802	44.683	44.842	655763376	23.15	131583296	21.91	4.98	9-octadecenoico
44.882	44.842	45.033	111901342	3.95	36915710	6.14	3.03	9-octadecenoico
45.362	45.225	45.508	306933947	10.83	74350064	12.37	4.12	Octadecanóico
48.426	48.275	48.492	282309439	9.96	70115806	11.67	4.02	5,8,11,14-eicosatetraenoico
48.771	48.708	48.858	12155396	0.43	3638062	0.61	3.34	8,11,14-eicosatrienoico
49.183	49.108	49.233	3788630	0.13	1122554	0.19	3.37	11,14-icodienoico
49.289	49.233	49.367	3177812	0.11	870940	0.14	3.64	14-Eicosadecenoico
49.850	49.783	49.933	2862879	0.10	866942	0.14	3.30	Eicosanóico
54.299	54.242	54.367	1245002	0.04	349967	0.06	3.55	Docosanóico

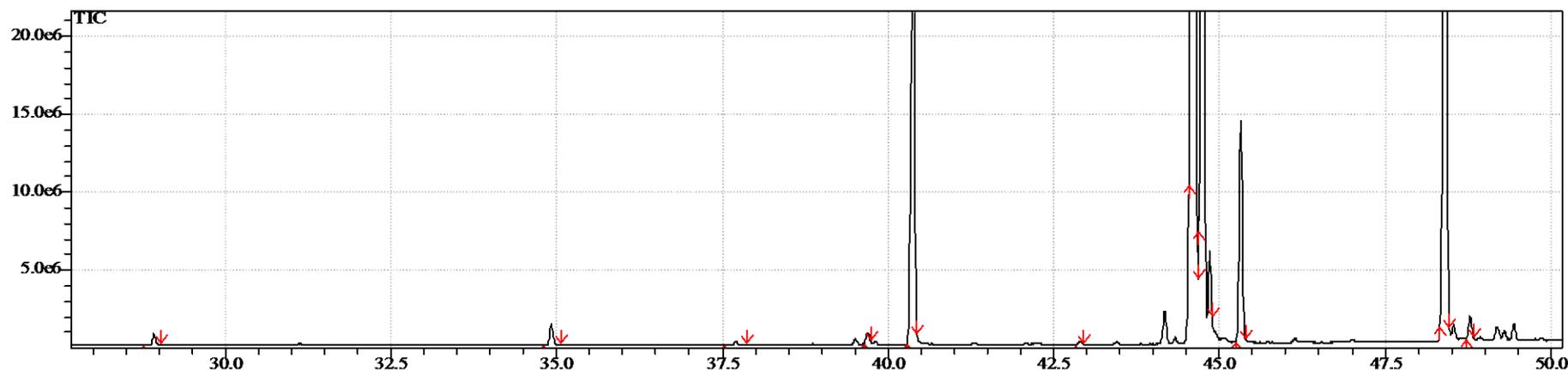
60.519	60.433	60.633	3202937	0.11	548341	0.09	5.84	Tetracosanóico
--------	--------	--------	---------	------	--------	------	------	----------------

### Apêndice 5 – Cromatograma dos ácidos graxos do fígado de rato do grupo CetoTAGC7



Tempo de retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área	%Área	Altura	%Altura	Área/Altura	Ácido graxo
28.925	28.858	29.000	731747	0.07	237682	0.09	3.08	Dodecanóico
34.917	34.833	35.017	3414910	0.35	1046161	0.41	3.26	Tetradecanóico
37.700	37.633	37.783	1606163	0.16	499701	0.20	3.21	Pentadecanóico
39.692	39.625	39.750	1641707	0.17	545400	0.21	3.01	9-hexadecenóico
40.392	40.258	40.500	205096602	20.78	54135298	21.14	3.79	Hexadecanóico
42.892	42.825	42.942	3119761	0.32	999804	0.39	3.12	Heptadecanóico
44.167	44.092	44.250	1502928	0.15	461690	0.18	3.26	9,12,15-octadetrienoíco
44.583	44.467	44.650	165977553	16.81	46525400	18.17	3.57	9,12-Octadecadienoíco
44.717	44.650	44.783	66439343	6.73	20251394	7.91	3.28	9-octadecenóico
44.833	44.800	44.900	10198140	1.03	3207420	1.25	3.18	9-octadecenóico
45.367	45.242	45.450	284328210	28.79	68692054	26.84	4.14	Octadecanóico
48.417	48.275	48.608	230777020	23.38	56902802	22.23	4.06	5,8,11,14-eicosatetraenoíco
49.858	49.792	49.925	1745964	0.18	591718	0.23	2.95	Eicosanóico
54.300	54.200	54.417	2440071	0.25	665370	0.26	3.67	Docosanóico
60.550	60.400	60.717	6718973	0.68	1006613	0.39	6.67	Tetracosanóico

### Apêndice 6 – Cromatograma dos ácidos graxos do fígado de rato do grupo CetoTAGsoja



Tempo de retenção	Tempo inicial	Tempo final	Área	%Área	Altura	%Altura	Área/Altura	Ácido graxo
28.925	28.767	29.025	2327694	0.27	717608	0.31	3.24	Dodecanóico
34.925	34.808	35.058	4199284	0.48	1369590	0.58	3.07	Tetradecanóico
37.708	37.533	37.858	660924	0.08	238562	0.10	2.77	Pentadecanóico
39.692	39.642	39.733	1725126	0.20	604821	0.26	2.85	9-hexadecenóico
40.383	40.292	40.442	139251797	16.04	40850251	17.39	3.41	Hexadecanóico
42.883	42.825	42.958	604245	0.07	213761	0.09	2.83	Heptadecanóico
44.630	44.533	44.675	380597121	43.84	88640396	37.74	4.29	9,12-octadecadienóico
44.750	44.692	44.892	141317953	16.28	46445648	19.77	3.04	9-octadecenóico
45.325	45.250	45.392	47268749	5.45	14059080	5.98	3.36	Octadecanóico
48.408	48.325	48.467	145557152	16.77	40387677	17.19	3.60	5,8,11,14- eicosatetraenóico
8.775	48.725	48.833	4479105	0.52	1384088	0.59	3.24	Eicosanóico

