

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

***ESTEATOSE HEPÁTICA: RELAÇÃO COM A SÍNDROME
METABÓLICA E EFEITO INDUTOR DE DIETAS PADRÃO
UTILIZADAS EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL***

JULIANA CÉLIA DE FARIAS SANTOS

MACEIÓ-2008

JULIANA CÉLIA DE FARIAS SANTOS

***ESTEATOSE HEPÁTICA: RELAÇÃO COM A SÍNDROME
METABÓLICA E EFEITO INDUTOR DE DIETAS PADRÃO
UTILIZADAS EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL***

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

Orientadora: **Prof.^a Dra. Terezinha da Rocha Ataíde**
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientadora: **Prof.^a Dra. Suzana Lima de Oliveira**
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ-2008

Dedicado a Deus, aos meus pais, Maria José e Durval Heleno, por todo amor, ao meu esposo, Evaldo Peixoto, meu grande companheiro, e a minha filha Camila Farias Peixoto.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.^a Dra. Terezinha Ataíde, pelos ensinamentos da vida profissional e pessoal; apoio, incentivo e motivação pela pesquisa científica; e, principalmente, pela amizade e carinho.

Àqueles que despertaram em mim o interesse pela carreira acadêmica e pela pesquisa, Prof. José de Souza Leão, Prof.^a Suzana Lima de Oliveira (minha querida co-orientadora) e Prof. Haroldo da Silva Ferreira, pessoas que fizeram a diferença na minha formação profissional.

As minhas queridas colegas do grupo de trabalho, nomeado “Projeto Juju”, Júnia Helena Porto Barbosa, Katherine Maria de Araújo Veras, Tâmara Kelly de Castro Gomes, Fernanda Maria de Banneux Leite e Renata Tenório Antunes.

Ao Prof. Dr. Cyro Rego Cabral Jr. pelas análises estatísticas e por sua grande contribuição com as pesquisas do nosso grupo.

As minhas companheiras de trabalho, em especial Zilda Teixeira, pela imensa compreensão em todos os momentos do meu mestrado, Antonísia Ribeiro, Eliane Teles e Karinna Fragoso, por todo incentivo e apoio.

Em especial aos colegas do mestrado, Júnia Helena Porto Barbosa, minha grande amiga e companheira de trabalho a qual espero encontrar em todos os caminhos da minha vida, e a outra pessoa que contribuiu imensamente para a realização desse trabalho, Ana Luiza Lucena.

***“Eu vou ser mais do que eu sou
para cumprir as promessas que eu fiz
porque eu sei que é assim
que os meus sonhos dependem de mim”***

Marina Elali

RESUMO

A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo de triacilgliceróis no citoplasma dos hepatócitos a um nível que atinge 5 a 10% do peso do fígado. Esta entidade faz parte do conjunto de alterações que caracterizam a doença do fígado gorduroso não alcoólica, que abrange, também, alterações mais graves como a esteato-hepatite não alcoólica, fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Sua etiologia, apesar de não estar totalmente elucidada, apresenta forte correlação com a resistência à insulina, sendo, atualmente, considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica. A infiltração gordurosa é uma típica resposta hepática à exposição prolongada a estímulos nocivos, incluindo hipóxia, toxinas, inflamação sistêmica, malignidades, deficiências nutricionais, inanição e vários distúrbios metabólicos. Entretanto, apesar de ter sido considerada por muito tempo como uma entidade benigna, sabe-se que a combinação sinérgica com outros fatores, como o estresse oxidativo, pode desencadear reações inflamatórias em cascata, levando à evolução da doença. Em estudos com animais de experimentação, modificações dietéticas podem induzir o quadro de esteatose hepática; no entanto, em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, constatou-se o surgimento da patologia em grupos de animais alimentados com dietas padrão, livres de modificações de sua composição original. Visando contribuir com a discussão do problema, esta dissertação apresenta dois artigos: uma revisão da literatura com os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos com o surgimento da esteatose e sua relação com a síndrome metabólica; o segundo artigo refere-se a um estudo experimental com ratos *Wistar* recém desmamados, que receberam dois tipos de dieta: uma comercial à base de cereais, Nuvilab®, e outra purificada proposta pelo *American Institute of Nutrition*, na versão 93, AIN-93. Nas condições experimentais estabelecidas, os animais que consumiram a dieta AIN-93 apresentaram 90,5% dos casos de esteatose hepática, 42,9% no grupo submetido à dieta AIN-93 G e 47,6% naquele submetido à dieta AIN-93M, observados através de análise histológica. Tal achado demonstra que apesar das modificações em sua composição em relação à versão anterior, AIN-76A, particularmente em seu conteúdo em sacarose, colina e no aminoácido sulfurado metionina, o problema persiste, sugerindo que a dieta AIN-93 ainda não representa a formulação mais apropriada para alimentação de roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento.

Palavras-chave: Esteatose hepática; síndrome metabólica; resistência à insulina; dieta AIN-93.

ABSTRACT

The hepatic steatosis is an accumulation of triglycerides in the cytoplasm of the hepatocytes at a level which affects 5 to 10% of the weight of the liver. This entity is part of series of changes that characterize the disease of non-alcoholic fatty liver, which covers, too, changes like non-alcoholic esteatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Its etiology, despite not being fully elucidated, shows strong correlation with insulin resistance, and, currently, considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. This fatty infiltration is a typical response to long-term exposure to harmful stimuli, including hypoxia, toxins, systemic inflammation, malignancies, nutritional deficiencies, starvation and various metabolic disorders. However, despite having been considered for a long time as a benign entity, it is known that the synergistic combination with other factors such as oxidative stress, can trigger reactions in inflammatory cascade, leading to the evolution of the disease. In studies with experimental animals, dietary changes can induce the framework of steatohepatitis, but on previous work done by our group, the onset of disease in groups of animals fed on standard diets, free of changes in its composition original, was observed. Aiming to contribute to the discussion of the problem, this thesis presents two articles: a literature review with the main pathophysiological mechanisms with the advent of steatosis and its relationship with metabolic syndrome, the second article refers to an experimental study with rats newly weaned, who received two kinds of diet: a chow diet Nuvilab® and a purified diet proposed by the American Institute of Nutrition, AIN-93. Under the experimental conditions established, the animals that consumed the AIN-93 diet had 90.5% of cases of steatosis, 42.9% in the group subjected to diet AIN-93 G and 47.6% in the group subjected to diet AIN-93 M, observed by histological analysis. This finding shows that despite the changes in its composition to the earlier version, AIN-76A, particularly in its content as sucrose, choline and the amino acid methionine, the problem persists, suggesting that the AIN-93 diet still does not represent the formulation more appropriate for feed for laboratory rodents, especially in the growing phase.

Key words: liver steatosis, metabolic syndrome, insulin resistance, AIN-93 diet.

LISTA DE FIGURAS

p.

1º artigo: artigo de revisão

Esteatose: o componente hepático da síndrome metabólica

Figura 1 Acúmulo hepático de triacilgliceróis (TAG) na resistência à insulina..... 28

2º artigo: artigo de resultados

Repercussões hepáticas da dieta AIN 93 em ratos *Wistar*

Figura 1 Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose grau 0- ausência (**A**), grau 1- leve (**B**), grau 2- levemente moderado (**C**), grau 3- moderado (**D**), grau 4- grave (**E**) e grau 5- grave com presença de pseudocistos (seta) (**F**)..... 58

Figura 2 Correlação linear de Spearman entre esteatose e peso absoluto do fígado (**A**), peso corporal final (**B**), alanina aminotransferase (**C**) e aspartato aminotransferase (**D**), e correlação linear de Pearson entre peso absoluto do fígado e peso corporal final (**E**) e entre graus de esteatose hepática e peso absoluto do fígado (**F**). Esteatose hepática: 1 – ausência, 2 – presença..... 64

LISTA DE TABELAS

		p.
Tabela 1	Composição da dieta AIN-93 nas versões G e M.....	56
Tabela 2	Composição da dieta comercial Nuvilab®.....	56
Tabela 3	Frequência de esteatose hepática (EH), graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), peso absoluto (PAF) e peso relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, NUV 1m e NUV 4m.....	60
Tabela 4	Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, NUV 1m e NUV 4m.....	62

Lista de abreviaturas

AGL – Ácidos graxos livres

AIN – *American Institute of Nutrition*

AIN- 93 1m – AIN-93 1 mês

AIN- 93 4m – AIN-93 4 meses

AIN- 93G – dieta AIN-93 para a fase de crescimento de roedores

AIN- 93M – dieta AIN-93 para a fase de manutenção de roedores

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

AST – Aspartato aminotransferase

CETP – Proteína de transferência de ésteres de colesterol

CRP – Proteína C reativa

DFGNA – Doença do fígado gorduroso não alcoólica

EH – Esteatose hepática

EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica

EST – Esterificação

GEH – Graus de esteatose hepática

GLUT2 – Transportador de glicose 2

GLUT4 – Transportador de glicose 4

GSH – Glutathiona reduzida

GSK-3 – Glicogênio sintetase 3

HDL-c – *Hight-density lipoprotein cholesterol*

HE – Hematoxilina-Eosina

IMC – Índice de massa corporal

IKK β - Quinase Kappa beta

IL-6 – Interleucina 6

IR – Receptor de insulina

IRS1 – Substrato do receptor de insulina 1

IRS2 – Substrato do receptor de insulina 2

JNK1 – Jun-N-terminal

LDL-c – *Low-density lipoprotein cholesterol*

LDN – Lipogênese de novo

LH – Lipase hepática

LHS – Lipase hormônio sensível

MTP – Proteína microsomal de transferência de triglicerídios

NF κ B – Fator nuclear kappa B

NUV - Nuvilab®

NUV 1m - Nuvilab® 1 mês

NUV 4m - Nuvilab® 4 meses

PAF – Peso absoluto do fígado

PCF – Peso corporal final

PI3 – Fosfatidil inositol 3 quinase

PKA – Proteína quinase A

PKB beta/Akt-2 – Proteína quinase B (Akt-2)

PKC- θ - Proteína quinase C θ

PRF – Peso relativo do fígado

QM - Quilomícron

SM – Síndrome metabólica

SOCS – Proteínas supressoras da sinalização intracelular de citocinas

SREBP – Proteína ligadora do elemento regulador do esterol

TAG - Triacilgliceróis

TNF α - Fator α de necrose tumoral

VLDL-c – *Very low-density lipoprotein cholesterol*

γ -GT – Gama-glutamil transferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	18
1º artigo: artigo de revisão	
Esteatose: o componente hepático da síndrome metabólica.....	19
2º artigo: artigo de resultados	
Repercussões hepáticas da dieta AIN 93 em ratos <i>Wistar</i>	48
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A esteatose hepática (EH) é definida pela Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado como um acúmulo de gordura hepática que excede 5-10% do peso do órgão, ou como uma dada porcentagem de hepatócitos carregados de gordura, observados à microscopia ótica (FESTI et al., 2004). Faz parte do conjunto de alterações que caracteriza a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA), termo clínico-patológico que abrange desde a própria esteatose à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e, como última conseqüência, carcinoma hepatocelular (BROWNING; HORTON, 2004; FESTI et al., 2004).

O conteúdo de triacilgliceróis (TAG) nas células hepáticas é regulado pela atividade integrada de moléculas celulares que facilitam a sua entrada no fígado, a síntese e a esterificação de ácidos graxos, *input*, e a oxidação de ácidos graxos e exportação de TAG hepáticos, *output*. A esteatose ocorre quando há maior captação e síntese do que oxidação ou exportação de TAG (DEN et al., 2004); ou seja, quando o valor importado ou sintetizado de ácidos graxos pelo fígado excede o valor de exportação (síntese e secreção de VLDL) ou catabolismo (β -oxidação) (ANSTEE; GOLDIN, 2006).

A infiltração gordurosa é uma típica resposta hepática à exposição prolongada a estímulos nocivos, incluindo hipóxia, toxinas, inflamação sistêmica, malignidades, deficiências, inanição e vários distúrbios metabólicos. Entretanto, o fígado gorduroso ainda é considerado uma condição benigna, pois, apenas 3% dos casos evoluem para estágios mais avançados de alteração hepática, como fibrose, cirrose, hepatocarcinoma e necrose (MATTEONI et al., 1999; CALDWELL; HYLTON, 2005).

A patogênese da esteatose hepática não alcoólica é multifatorial; no entanto, tem-se sugerido que a resistência à insulina, associada à síndrome metabólica (SM), freqüentemente observada em indivíduos com sobrepeso e obesidade, é um requerimento essencial para o acúmulo de gordura no hepatócito (CHITTURI et al., 2002; MARCHESINI et al., 1999).

Em estudos com experimentação animal, modificações dietéticas podem induzir o quadro de EH; no entanto, em trabalhos anteriormente realizados por nosso grupo de estudo (ATAIDE et al., *in press*; LUCENA, 2007) observou-se a doença, com o uso de dieta padrão livre de qualquer manipulação dietética que pudesse induzi-la.

As dietas padrão em uso na pesquisa científica foram concebidas por instituições de pesquisa ou formuladas por indústrias agropecuárias. Para animais de laboratório, as dietas são colocadas em três categorias: dietas não refinadas ou não purificadas, à base de cereais, dietas purificadas e dietas quimicamente definidas (REEVES, 1997).

O *American Institute of Nutrition* (AIN), no período entre 1977 e 1980, publicou uma fórmula de dieta purificada para roedores, AIN-76 e, posteriormente, AIN-76A, adotada como dieta padrão em diversos estudos. Esta dieta foi utilizada durante anos na sua formulação original ou com modificações previstas em protocolos experimentais. No entanto, foram descobertos numerosos problemas com o seu uso, como hiperlipidemia e lesões hepáticas, notadamente esteatose (MEDINSKY et al., 1982; REEVES, 1997). Daí surgiu a AIN-93, uma versão reformulada da AIN-76A, que teve como objetivo extinguir os problemas advindos da antiga versão e prover uma melhoria do desempenho dos animais de experimentação.

Esta dissertação é composta por dois artigos; o primeiro, de revisão da literatura, discute a fisiopatologia da EH e as suas interações com a resistência à insulina, a dislipidemia e a síndrome metabólica. Conclui-se que a EH está associada à resistência à insulina e aos diversos componentes da SM. Na gênese das alterações hemodinâmicas e metabólicas associadas à SM, o metabolismo do tecido adiposo parece desempenhar papel central.

O segundo artigo, que avalia as repercussões hepáticas associadas ao consumo de dietas padrão para roedores, por meio de ensaio experimental, aponta a dieta AIN-93 como indutora do quadro de EH, de maior gravidade nos animais mais jovens. Tal achado sugere que a versão atual da dieta AIN ainda não representa a formulação mais apropriada para a alimentação de roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento.

1º artigo: artigo de revisão

SANTOS, JCF; ATAIDE, TR; OLIVEIRA, SL; BARBOSA, JHP; CARVALHO, CRO. Esteatose: o componente hepático da síndrome metabólica.

RESUMO

A síndrome metabólica, conhecida como a síndrome de resistência à insulina, caracteriza-se pela coexistência variável de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. Atenção tem sido focalizada no acúmulo excessivo de triacilgliceróis no fígado como parte da síndrome metabólica, devido a alta prevalência de fígado gorduroso observada em pacientes com a doença. O objetivo deste estudo foi discutir, através de revisão da literatura, alguns aspectos da etiologia da esteatose hepática não alcoólica e da resistência à insulina, apontando a esteatose como o componente hepático da síndrome metabólica. A esteatose hepática é uma hepatopatia comum, que decorre do acúmulo de gordura histologicamente visível nos hepatócitos. O principal fator etiológico é o aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado, causado por sua maior disponibilidade no plasma em relação aos requerimentos oxidativos periféricos. O fígado gorduroso é resistente à insulina e apresenta grande correlação com os demais componentes da síndrome metabólica, independentemente da obesidade. Como principal alteração na síndrome tem-se a dislipidemia, caracterizada pelo aumento de ácidos graxos livres e de triacilgliceróis, redução dos valores de HDL-colesterol e aumento das concentrações de apolipoproteína-B circulantes, o que ocasiona um maior influxo de gordura nas células hepáticas, sugerindo forte associação etiopatogênica entre a síndrome metabólica e a esteatose hepática. Portanto, o aumento de ácidos graxos livres constitui-se o elo entre a resistência à insulina, a dislipidemia e o desenvolvimento de esteatose hepática, componentes da síndrome metabólica.

Palavras-chave: fígado gorduroso, síndrome metabólica, resistência à insulina.

ABSTRACT

Metabolic syndrome, also known as the insulin resistance syndrome, is characterized by the coexistence of obesity, hyperinsulinemia, dyslipidemia and systemic arterial hypertension. Attention has been focused on the excessive accumulation of triacylglycerides in the liver as part of the metabolic syndrome, due to high prevalence of fatty liver observed in patients with the disease. The purpose of this study was to discuss, by reviewing the literature, some aspects of the etiology of non-alcoholic hepatic steatosis and insulin resistance, pointing to steatosis as the hepatic component of the metabolic syndrome. Hepatic steatosis is a common liver disease which derives from the accumulation of histologically visible fat in the hepatocytes. The principal etiological factor is the increased flow of free fatty acids in the liver, caused by its greater availability in plasma in relation to the peripheral oxidative requirements. The fatty liver is resistant to insulin and presents a high correlation with the other components of metabolic syndrome, regardless of obesity. As the main change in the syndrome has been the dyslipidemia, characterized by increased free fatty acids and triacylglycerides, a reduction of the levels of HDL cholesterol and increased concentrations of circulating apolipoprotein B, which causes a greater influx of fat in the liver cells, suggests a strong etiopathogenic association between metabolic syndrome and hepatic steatosis. Therefore, the increase of free fatty acids constitutes the link between insulin resistance, dyslipidemia and the development of hepatic steatosis, components of metabolic syndrome.

Key words: fatty liver, metabolic syndrome, insulin resistance.

INTRODUÇÃO

A doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA) é um termo clínico-patológico que abrange um espectro de alterações que varia do simples acúmulo de triacilgliceróis (TAG) nos hepatócitos, esteatose hepática (EH), à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e, como última conseqüência, carcinoma hepatocelular (BROWNING; HORTON, 2004; FESTI et al., 2004). A Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado definiu a DFGNA como um acúmulo de gordura hepática que excede 5-10% do peso do órgão, ou como uma dada porcentagem de hepatócitos carregados de gordura, observados à microscopia ótica (FESTI et al., 2004).

O mecanismo exato da progressão de EH para EHNA é desconhecido. A hipótese mais aceita atualmente é a de Day e James, de 1998, que propuseram o modelo dos dois *hits*. O primeiro *hit* é constituído pelo mecanismo que causa a EH, ou seja, a agressão inicial. Assim, a resistência à insulina, que promove hiperinsulinemia, favorecendo a lipólise no tecido adiposo, aumenta excessivamente o aporte de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, podendo resultar em EH. O primeiro *hit* deixa o hepatócito mais vulnerável ao segundo *hit*, agressões promovidas por vírus, álcool e lipopolissacarídeos, dentre outros, os quais promovem estresse oxidativo hepático, levando à EHNA, à cirrose e ao hepatocarcinoma.

Outro modelo, defendido por Wanless e Shiota, em 2004, propõe quatro etapas de evolução da EH para quadros mais graves de comprometimento do órgão. As duas primeiras etapas são constituídas pelos *hits* de Day e James, a terceira, pelo extravasamento de lipídios para o interstício hepático, levando ao

dano direto e à inflamação das veias hepáticas, e, a quarta etapa, pela obstrução venosa, com colapso secundário, fibrose e cirrose.

Recentemente, os termos DFGNA primária e secundária foram introduzidos para indicar, respectivamente, a DFGNA não atribuível a um único fator etiológico e a DFGNA na qual drogas, procedimentos cirúrgicos e condições outras exercem um papel primário (FESTI et al., 2004).

A elevada prevalência da DFGNA, seu potencial para graves seqüelas e os fatores etiológicos subjacentes que determinam a progressão da doença permanecem mal compreendidos. Estudos sugerem que a DFGNA é a mais importante causa de cirrose criptogênica, enquanto que uma fração dos pacientes com DFGNA evoluem para carcinoma hepatocelular. O risco desta complicação maligna é aumentado mais de quatro vezes em pacientes cirróticos comparados com a população em geral (QURESHI; ABRAMS, 2007). A esteatose, no entanto, é uma lesão estável em que só 3% dos casos evoluem para lesões mais graves, enquanto a EHNA evolui para cirrose, em 15 a 25% dos casos (MATTEONI et al., 1999; CALDWELL; HYLTON, 2005).

A patogênese da esteatose hepática não alcoólica é multifatorial; sugere-se que a resistência à insulina, associada à síndrome metabólica (SM), freqüentemente observada em indivíduos com sobrepeso e obesidade, é um requerimento essencial para o acúmulo de gordura no hepatócito (CHITTURI et al., 2002; MARCHESINI et al., 1999).

Atenção tem sido focalizada no acúmulo excessivo de TAG no fígado como parte da SM (DEN et al., 2004). De fato, observa-se alta prevalência de fígado gorduroso em pacientes com tal síndrome, definida como uma associação, em um mesmo indivíduo, de pelo menos três das seguintes alterações: hipertensão

arterial ($\geq 130/85$ mm/Hg), obesidade central (cintura ≥ 90 cm em homens; ≥ 80 cm em mulheres), hiperglicemia de jejum (≥ 100 mg/dL), hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL) ou decréscimo da HDL (< 40 mg/dL em homens; < 50 mg/dL em mulheres) (IDF, 2006).

A SM, um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, está usualmente relacionada à deposição central de gordura e à resistência à insulina. Associa-se com aumento da mortalidade geral, em cerca de 1,5 vezes, e da cardiovascular, em cerca de 2,5 vezes (LAKKA et al., 2002; GIRMAN et al., 2004). Estudos em diferentes populações, como a mexicana, a norte-americana e a asiática, revelam prevalências elevadas da SM, variando de 12,4 a 28,5% em homens e de 10,7 a 40,5% em mulheres, dependendo do critério utilizado e das características da população estudada (FORD; GUILLES, 2003; HU et al., 2004; AGUILAR et al., 2004; OH et al., 2004).

Estudos sobre a prevalência da SM no Brasil são escassos. Santos et al. (2003) realizaram um estudo transversal com 38 diabéticos tipo 2, 18 homens e 20 mulheres, com idade entre 29 e 75 anos, atendidos em um hospital universitário do Rio de Janeiro, sem tratamento dietoterápico. Nesse estudo, detectou-se que 89% da população masculina e 95% da feminina eram portadores da SM. Já no trabalho de Tavares (2005), realizado com indivíduos acima de 18 anos atendidos no Ambulatório de Nutrição do Centro Médico da Caixa Beneficente dos Policiais Militares de Alagoas, a prevalência da síndrome foi de 28% na população geral, 29% no sexo feminino e 25,3% no masculino. Outro dado importante no estudo de Tavares foi a caracterização do estado nutricional, onde 39,5% da população apresentava sobrepeso, 35,1% obesidade, 2,92% magreza e apenas 22,4% eutrofia, com obesidade abdominal como o

critério diagnóstico da SM mais prevalente: 42% na população geral, 50% na feminina e 27% na masculina. Neste estudo, houve correlação positiva altamente significativa entre o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência da cintura, em ambos os sexos ($r=0,835$, $p<0,0001$, para o sexo masculino, e $r=0,732$, $p<0,0001$, para o feminino).

O fígado gorduroso é resistente à insulina e altamente correlacionado com todos os componentes da SM, independentemente da obesidade. Neste quadro, a produção aumentada de glicose, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), proteína C reativa (CRP) e fatores de coagulação podem contribuir para o risco adicional de doença cardiovascular associada com a SM e a DFGNA. Estas entidades aumentam, também, o risco do *diabetes* tipo 2 e o avanço da doença hepática (KOTRONEN; YKI-JÄRVINEN, 2008).

O objetivo deste trabalho foi discutir a etiologia da esteatose hepática e da resistência à insulina, apontando a esteatose como o componente hepático da síndrome metabólica.

A ESTEATOSE HEPÁTICA

A esteatose hepática é uma hepatopatia comum, que decorre do acúmulo de gordura histologicamente visível nos hepatócitos. O conteúdo de TAG nas células hepáticas é regulado pela atividade integrada de moléculas celulares que facilitam a entrada de TAG no fígado, a síntese de ácidos graxos e sua esterificação, *input*, e a oxidação de ácidos graxos e exportação de TAG hepáticos, *output*. A esteatose ocorre quando há maior captação do que oxidação ou exportação de TAG (DEN et al., 2004); ou seja, quando o valor importado ou sintetizado de ácidos graxos pelo fígado excede o valor de exportação (síntese e secreção de VLDL) ou catabolismo (β -oxidação) (ANSTEE; GOLDIN, 2006).

A depender do padrão de acúmulo de lipídios, a esteatose é subdividida em macrovesicular e microvesicular. Na esteatose macrovesicular observam-se vacúolos citoplasmáticos únicos que deslocam o núcleo da célula para a periferia. O acúmulo crescente de lipídios pode promover ruptura e coalescência de células tumefeitas adjacentes, com conseqüente formação de um grande vacúolo (pseudocisto). Na esteatose microvesicular, no entanto, observa-se acúmulo intracitoplasmático de pequenos vacúolos de lipídios, que não deslocam o núcleo da sua posição central (GAYOTTO et al., 2001).

Os mecanismos fisiopatológicos das duas formas de expressão morfológica da esteatose são diferentes. No primeiro caso, o mecanismo básico está relacionado ao aumento do fluxo de AGL para o fígado e à redução da mobilização de gorduras a partir dele. No segundo, ocorre diminuição da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, gerando um distúrbio maior no metabolismo oxidativo da célula. Neste caso, expressão da forma aguda da esteatose, o prognóstico é mais grave, podendo levar à insuficiência hepática e ao óbito (GAYOTTO et al., 2001).

A maioria dos indivíduos com esteatose é assintomática. No entanto, a anormalidade mais comum nos marcadores de lesão hepática é a elevação de duas a três vezes dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A relação AST/ALT geralmente é menor que um; quando é maior que um, presume-se avanço da doença. Doenças hepáticas com $AST/ALT < 1$ são freqüentemente relacionadas à obesidade, à falta de exercícios físicos e à hiperlipidemia. Relações $AST/ALT > 1$, por sua vez, ao consumo de álcool e ao *diabetes mellitus* (SCHEEN; LUYCKX, 2002). Níveis

elevados de ALT na DFGNA sugerem o futuro desenvolvimento de *diabetes* (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006).

A infiltração gordurosa é uma típica resposta hepática à exposição prolongada a estímulos nocivos, incluindo hipóxia, toxinas, inflamação sistêmica, malignidades, deficiências, inanição e vários distúrbios metabólicos. No entanto, o fígado gorduroso ainda é considerado uma condição benigna, pois, apenas 3% dos casos evoluem para estágios mais avançados de alteração hepática, como fibrose, cirrose, hepatocarcinoma e necrose (MATTEONI et al., 1999; CALDWELL; HYLTON, 2005).

A maior causa de esteatose hepática é o aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado, causado por maior disponibilidade de AGL no plasma em relação aos requerimentos oxidativos periféricos. A ingestão de gordura superior às necessidades celulares, ou ainda, uma maior liberação de ácidos graxos dos depósitos do tecido adiposo para a corrente sanguínea determinam um aumento dos níveis séricos de AGL (DEN et al., 2004). De fato, a explicação convencional para o acúmulo de TAG no fígado, nos quadros de resistência à insulina e obesidade, é o aumento da liberação de AGL pelos adipócitos observado nessas circunstâncias. A massa aumentada de adipócitos e o aumento da hidrólise de TAG, através da maior atividade da lipase hormônio sensível, contribuem para elevar os níveis plasmáticos de AGL, os quais são independentemente incorporados pelo fígado, numa proporção relativa às concentrações plasmáticas (BROWNING; HORTON, 2004; QURESHI; ABRAMS, 2007). O mecanismo proposto do acúmulo hepático de TAG na resistência à insulina encontra-se esquematizado na Figura 1.

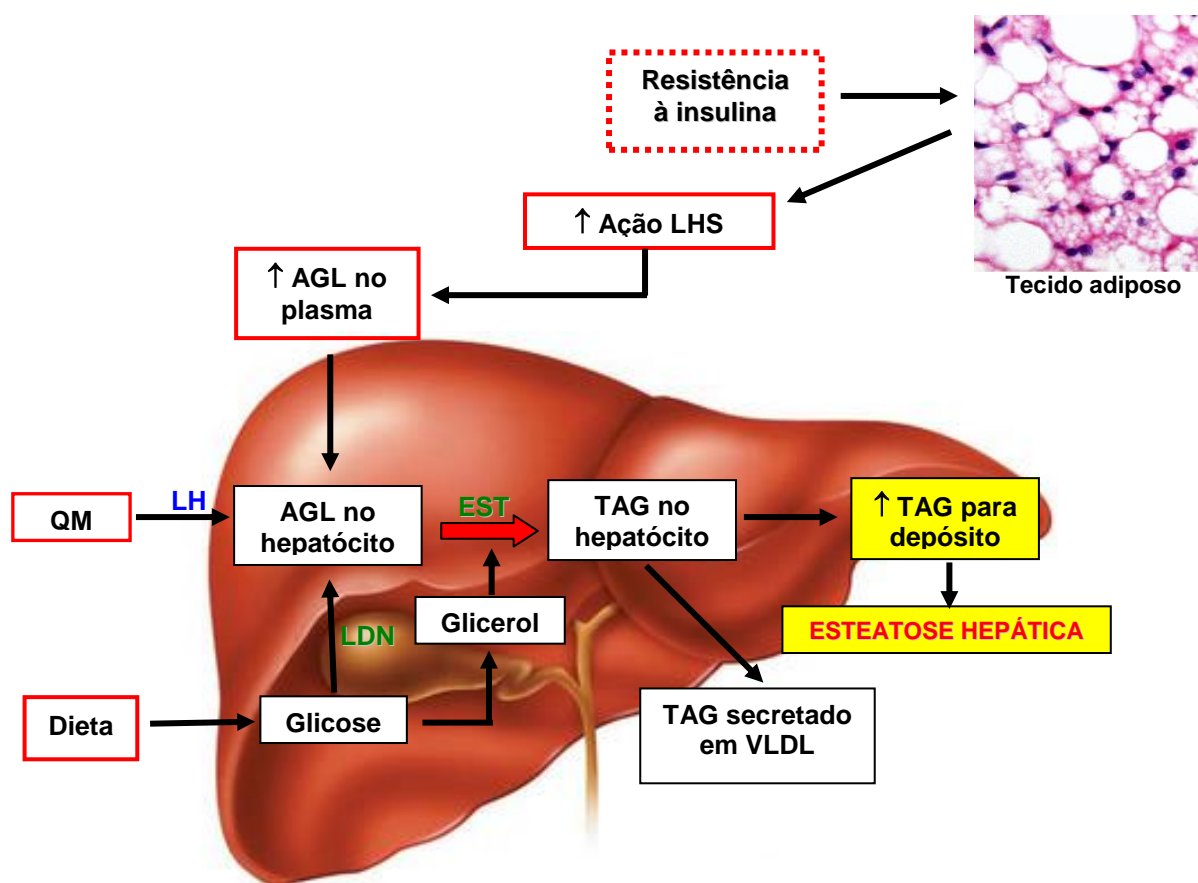


Figura 1 – Acúmulo hepático de triacilgliceróis (TAG) na resistência à insulina. O aumento da atividade da lipase hormônio sensível (LHS) ocasiona maior fluxo de ácidos graxos livres (AGL) para o fígado, estímulo primário para a esteatose hepática. QM: quilomícron; LH: lipase hepática; LDN: lipogênese *de novo*; EST: esterificação; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. Baseado em: Qureshi e Abrams (2007).

A resistência hepática à insulina pode ser definida como uma falha desse hormônio em suprimir adequadamente a produção hepática de glicose. No entanto, a ação lipogênica da insulina não parece estar comprometida em estados insulino-resistentes (WEICKERT; PFEIFFER, 2006). Em indivíduos com *diabetes* tipo 2, a DFGNA é muito comum, sendo demonstrado acúmulo de gordura hepática, por ultrassom, em 50 a 75% dos casos. Adicionalmente, a presença de *diabetes* tem sido identificada como um fator de risco para a EHNA em uma série de autopsias, mostrando um aumento de 2,6 vezes do risco de esteato-hepatite em indivíduos hiperglicêmicos (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006).

A resistência à insulina, por si só, está associada com o acúmulo de gordura hepática, independentemente do IMC ou da presença de obesidade intra-abdominal (WEICKERT; PFEIFFER, 2006). No entanto, a obesidade é certamente o fator mais comum associado à DFGNA.

Outras causas de esteatose hepática também têm sido reconhecidas, como medicamentos estrógenos, tamoxifeno, altas doses de glicocorticóides e amiodarona, alterações na nutrição e absorção intestinal, como na anastomose jejuno-ileal, rápida perda de peso, nutrição parenteral total, exposição ocupacional a hepatotoxinas, síndromes familiares de severa resistência à insulina, como a lipodistrofia, e desordens do metabolismo lipídico, como a deficiência de apolipoproteína B (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006).

Em alguns enfermos descreve-se polimorfismo na proteína microsomal de transferência de triglicerídeos, *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). Esta proteína incorpora TAG à apolipoproteína B no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi, dando lugar à formação de VLDL. Quando a atividade da MTP está reduzida, a exportação de lipídios diminui, ocasionando sua retenção em células hepáticas e, conseqüentemente, esteatose. Nas enfermidades em que existem mutações na MTP é habitual que ocorra a esteatose hepática, como, por exemplo, na infecção crônica pelo vírus da hepatite C, principalmente do genótipo 3 (ANSTEE; GOLDIN, 2006).

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese da esteatose hepática e esteato-hepatite. Day e James (1998) propuseram inicialmente um modelo multifatorial para explicar a progressão da esteatose hepática não alcoólica. O primeiro evento constitui a deposição de TAG no citoplasma do hepatócito; esta, por sua vez, sensibiliza o

fígado tornando-o vulnerável a uma variedade de insultos, eventos posteriores, que culminariam com necro-inflamação, morte celular e fibrose, marcadores histológicos da EHNA.

Dentre os modelos animais, destacam-se os camundongos geneticamente obesos e diabéticos (ob/ob), os camundongos lipoatróficos diabéticos e os ratos ou camundongos normais alimentados com dietas deficientes em colina e metionina. No entanto, tais modelos podem não refletir adequadamente a fisiopatologia da EHNA em humanos (BROWNING; HORTON, 2004).

Camundongos ob/ob representam um modelo de ocorrência natural da doença do fígado gorduroso não alcoólica. Eles são deficientes em leptina, um hormônio sintetizado pelo tecido adiposo branco, que inibe o apetite e aumenta o gasto de energia, pela ação sobre os neurônios anorexígenos no núcleo mediano ventral do hipotálamo. Além disso, são resistentes à insulina e hiperinsulinêmicos, com resultante hiperglicemia e hiperlipidemia (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Os camundongos lipoatróficos diabéticos, geneticamente alterados, por sua vez, apresentam destruição dos adipócitos, com conseqüente lipoatrofia generalizada. Eles desenvolvem resistência à insulina, hiperinsulinemia, esteatose hepática e deficiência de leptina (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Todos os modelos experimentais deficientes ou resistentes à leptina apresentam obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, aumento do fator alfa de necrose tumoral (TNF α) e doença do fígado gorduroso (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Outro mecanismo desencadeador da patologia constitui-se na deficiência de alguns componentes dietéticos. Como exemplo, tem-se a eliminação de

metionina e colina da dieta, ocasionando acúmulo de gordura intra-hepática. A metionina e a colina são precursores importantes da fosfatidilcolina, o fosfolípido principal que compreende o revestimento exterior das partículas de VLDL. Nesta situação, a esteatose é resultado da secreção hepática prejudicada de TAG, devido à formação defeituosa de VLDL (RIZKI et al., 2006).

Veteläinen et al. (2007) observaram que dieta deficiente em colina induz esteatose menos severa, quando comparada com a progressiva inflamação e a fibrinogênese induzidas pela dieta deficiente em metionina e colina, em ratos. O estudo demonstrou que dietas deficientes em colina e em metionina e colina representam dois modelos patogênicos diferentes de esteatose. Ratos e camundongos alimentados com dietas deficientes em colina e metionina são severamente exauridos de antioxidantes hepáticos, como a glutatona reduzida (GSH) e a S-adenosilmetionina. Tais animais são mais vulneráveis ao estresse oxidativo, uma situação que induz à síntese de $TNF\alpha$ e outras citocinas pró-inflamatórias. Agentes oxidantes e o $TNF\alpha$ ativam a enzima inibidora da quinase Kappa beta ($IKK\beta$) nos adipócitos e hepatócitos, levando à resistência à insulina e à DFGNA (KOTEISH; DIEHL, 2002; DAY, 2002).

A contribuição desses modelos experimentais para a compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na gênese e evolução da DFGNA, via estresse oxidativo, é inestimável.

A resistência à insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células beta do pâncreas endócrino, que atua como principal hormônio anabolizante do organismo. Sua síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (ZECCHIN et al., 2004). A insulina age em

diversos tecidos periféricos, incluindo músculos, fígado e tecido adiposo, nos quais produz um aumento da síntese de proteínas, glicogênio e lipídios, incorporação da glicose plasmática pelas células insulino-dependentes, diminuição da gliconeogênese, glicogenólise, proteólise e lipólise (SOLÍS et al., 2006).

Além de seus efeitos clássicos na homeostase glicêmica, também apresenta atividades antiinflamatórias, de forma que, um estado de resistência à insulina não apenas reduz a utilização de glicose pelos tecidos insulino-sensíveis, como, também, estimula a sinalização pró-inflamatória (MACHADO et al., 2006). Outras funções da insulina incluem o aumento da produção de óxido nítrico no endotélio, a prevenção da apoptose, ou morte celular programada, e a promoção da sobrevivência celular (ZECCHIN et al., 2004).

A interação da insulina com seu receptor específico (IR) estimula a atividade tirosina quinase desse receptor, sua autofosforilação e a fosforilação em tirosina de proteínas intracelulares, denominadas substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1, IRS-2). Em seguida, ocorre a ativação da fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) que medeia a translocação do transportador de glicose, GLUT-4, nos tecidos adiposo e muscular estriado, do interior de vesículas citoplasmáticas para a membrana da célula, com subsequente aumento da captação de glicose (SOLÍS et al., 2006). A cascata de fenômenos que segue à ligação da insulina ao seu receptor é bem mais ampla e vários desses fenômenos são melhor compreendidos através do estudo da resistência à insulina.

A resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida onde concentrações fisiológicas do hormônio provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células musculares e gordurosas. Em consequência da

menor captação de glicose, há resposta adaptativa de maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção da glicemia normal, aumentando-se, desta forma, a insulinemia; portanto, a situação de resistência à insulina é freqüentemente acompanhada de hiperinsulinemia. Nesta situação, não são observadas alterações nas demais funções do hormônio (CESARETTI; JUNIOR, 2006).

Os fatores que determinam a resistência à insulina provavelmente são múltiplos. Dentre eles destacam-se a esteatose hepática, o estresse oxidativo, o aumento do fluxo de AGL, o TNF α e mediadores intracelulares, como a ceramida, a IKK β , o fator nuclear kappa B (NF κ B), a proteína quinase C θ (PKC- θ), a quinase Jun-N-terminal (JNK1), o citocromo CYP2E1 e as proteínas supressoras da sinalização intracelular de citocinas (SOCS) (SOLÍS et al., 2006).

Resistência à insulina no tecido adiposo

Os efeitos lipogênicos e antilipolíticos da insulina são mediados pela PI3 quinase sobre a proteína ligadora do elemento regulador do esterol (SREBP), um fator de transcrição que desempenha papel essencial na ativação de diversos genes implicados na síntese de enzimas lipogênicas (carboxilase do acetil CoA; sintase de ácidos graxos; aciltransferase do glicerol-3-fosfato, etc.) e na excreção de VLDL, através da MTP (SOLÍS et al., 2006).

A ativação do IR determinada pela insulina provoca fosforilação do IRS-1 e IRS-2 no tecido adiposo, tornando-os alvos da associação e posterior ativação da PI3 quinase, com subsequente ativação de uma fosfodiesterase, que degrada o AMPc. A redução dos níveis intracelulares do AMPc determinará baixa ou nenhuma ativação da proteína quinase A (PKA), necessária à ativação da lipase hormônio sensível. Desta maneira, a insulina inibe a lipólise e a liberação de AGL

pelo tecido adiposo (SOLÍS et al., 2006). Em alguns estados de resistência à insulina, os efeitos descritos acima não são observados. No *diabetes* e na obesidade, por exemplo, observa-se o aumento de AGL circulantes, provenientes da lipólise de TAG nos adipócitos, associada com a resistência à insulina (ZECCHIN et al., 2004).

No tecido adiposo ocorre, também, uma regulação negativa do transportador de glicose, GLUT-4, com redução de sua expressão em alguns estados de resistência à insulina. Papa et al. (2002) revelaram que no início do processo de desenvolvimento da obesidade o ganho de peso é acelerado, com aumento na sensibilidade à insulina e da expressão do GLUT4 no tecido adiposo; posteriormente, quando a obesidade se estabiliza, sobrevém redução do GLUT4 nesse tecido, e a resistência à insulina se manifesta (MACHADO et al., 2006).

O músculo esquelético é o principal sítio de captação da glicose estimulada pela insulina. No entanto, o tecido adiposo, colaborando com apenas 20% dessa captação, influencia, por via indireta, a sensibilidade à insulina no músculo, através de peptídeos bioativos produzidos pelo próprio tecido adiposo, como o TNF α , a interleucina-6 (IL-6) e a resistina. E, ainda, pela maior produção de AGL, que pode reduzir significativamente o transporte de glicose para as células, competindo como substrato energético, especialmente nos músculos que apresentam intensa atividade oxidativa aeróbica (MACHADO et al., 2006). Na obesidade, a produção e a liberação dos AGL e dos produtos bioativos produzidos pelo tecido adiposo encontram-se exacerbadas, aumentando a resistência à insulina.

As diversas substâncias secretadas pelo tecido adiposo, denominadas adipocinas, podem influenciar profundamente o metabolismo e o gasto

energético. As adipocinas representam um elo entre a adiposidade e a síndrome metabólica, pois, em sua grande maioria, estão relacionadas, direta ou indiretamente, a processos que contribuem para a aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, *diabetes* tipo 2 e dislipidemia (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Dentre as adipocinas destaca-se o $TNF\alpha$, que ocasiona a ativação da $IKK\beta$ e a inibição da fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), conduzindo a um fracasso na supressão da lipase hormônio sensível, mediada pela insulina, aumentando a liberação de ácidos graxos livres circulantes (ANSTEE; GOLDIN, 2006) que, como já discutido, associa-se com resistência à insulina.

A expressão do $TNF\alpha$ está aumentada na gordura de roedores e humanos obesos. Em roedores, anticorpos anti- $TNF\alpha$ ou a ausência total do seu receptor melhoram significativamente o quadro de resistência à insulina (SETHI et al., 2000; UYSAL et al., 1997). Em humanos, no entanto, a importância deste mecanismo ainda é controversa, visto que estudos limitados com anticorpos anti- $TNF\alpha$ demonstram pouco ou nenhum efeito sobre o estado de resistência à insulina (OFEI et al., 1996).

É possível que tanto os AGL como o $TNF\alpha$ interfiram na transmissão do sinal gerado pela insulina ao provocarem a fosforilação da serina 307 do seu receptor. A fosforilação da serina é incompatível com a simultânea fosforilação em tirosina. Os AGL e o $TNF\alpha$ podem produzir aquela fosforilação, através da ativação da JNK1 (SOLÍS et al., 2006).

Dentre as adipocinas envolvidas diretamente com a sensibilidade à insulina, têm-se a leptina e a adiponectina. A leptina desempenha um papel

importante na regulação da ingestão alimentar, no controle do peso corporal, na composição corporal e no gasto energético. Sugere-se que este hormônio está envolvido com a patogênese da EHNA (SÁNCHEZ et al., 2005).

A adiponectina, por sua vez, está inversamente relacionada com a gordura intra-abdominal. Tal adipocina estimula o uso da glicose e a oxidação dos ácidos graxos no fígado, por ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Os níveis de adiponectina estão significativamente baixos em indivíduos com DFGNA ou EHNA, quando comparados com indivíduos de índice de massa corporal (IMC) normal (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006).

As concentrações plasmáticas de adiponectina são reguladas principalmente pela composição corpórea; tais concentrações são correlacionadas negativamente com o percentual e com a massa de gordura corporal (SÁNCHEZ et al., 2005). Weyer et al. (2001) observaram correlação entre decréscimos nas concentrações circulantes de adiponectina, hipoadiponectinemia, o desenvolvimento de resistência à insulina e várias doenças associadas com a resistência.

Elevados níveis de $TNF\alpha$ em obesos estão associados à supressão da secreção de adiponectina e GLUT-4 no tecido adiposo (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Observou-se que, em cultura de adipócitos de tecido adiposo visceral de indivíduos obesos, a concentração aumentada de $TNF\alpha$ inibe a expressão gênica de adiponectina, sugerindo um papel determinante sobre a sua secreção (HALLEUX et al., 2001).

Resistência à insulina no tecido hepático

A produção hepática de glicose é essencial para a manutenção de seus níveis circulantes normais. Durante estados de jejum, o fígado fornece glicose

para a circulação sanguínea, através da glicogenólise e da gliconeogênese. Quando os níveis de glicose estão aumentando, a produção de glicose hepática é rapidamente reduzida em resposta à elevação da insulina circulante (EISENBERG et al., 2005).

Os hepatócitos expressam predominantemente a isoforma GLUT-2, um transportador de glicose de alta capacidade e baixa afinidade, responsável pelo influxo de glicose no período pós-prandial e pelo seu efluxo no período pós-absortivo e no jejum (MACHADO et al., 2006). Desta forma, nos momentos de diminuição da glicemia o GLUT-2 apresenta-se em grandes quantidades na membrana plasmática do hepatócito, facilitando o efluxo hepático de glicose. No estado alimentado, em presença de insulina, ocorre diminuição do GLUT-2 na membrana da célula (EISENBERG et al., 2005).

Os mecanismos intracelulares desencadeados pela insulina no fígado diferem ligeiramente daqueles exercidos sobre o tecido adiposo e o músculo esquelético, pois, apesar de expressar em maior quantidade o IRS-1, o substrato do receptor de insulina com papel fisiológico mais importante naquele órgão parece ser o IRS-2 (PREVIS et al., 2000). Após a fosforilação em resíduos tirosina do IRS-2, há ativação da PI3 quinase e subsequente ativação da proteína quinase B, também denominada *Akt-2* (PKB beta/ *Akt-2*), que fosforila e inativa a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3). Desta forma, a síntese de glicogênio é estimulada. O IRS-2 também medeia outra ação da insulina, que é a ativação da SREBP, induzindo a expressão de genes lipogênicos, os quais determinam a síntese de ácidos graxos no fígado (SOLÍS et al., 2006).

Em estado pós-alimentar, ou absortivo, a glicose captada pelo hepatócito determina a síntese de glicogênio, até que seus estoques sejam restabelecidos. A

partir desse momento, a glicose deixa de participar da glicogênese e passa a ser processada preferencialmente pela glicólise, via ciclo de Krebs. Resumidamente, o citrato fornecido pelo ciclo é transportado para o citosol, onde é convertido à acetil-CoA, pela ATP citrato liase. A acetil-CoA carboxilase 1, converte, então, o acetil-CoA em malonil-CoA, que é utilizado na síntese de ácidos graxos (BROWNING; HORTON, 2004).

Os lipídios provenientes desse mecanismo são convertidos em TAG e transferidos para a VLDL, para exportação, ou são oxidados. A transferência de lipídios para a apolipoproteína B100, pela MTP, dentro do retículo endoplasmático, é o passo limitante da velocidade de formação de VLDL (ANSTEE; GOLDIN, 2006). Estudos em humanos têm demonstrado que mutações no gene que codifica a MTP são responsáveis por condições autossômicas recessivas de abetalipoproteinemia, caracterizada por esteatose hepática severa (WETTERAU et al., 1992; BERRIOT-VAROQUEAUX et al., 2000).

A resistência à insulina, em nível molecular, pode ser adquirida através de múltiplos mecanismos que afetam diferentes etapas de sua cascata de sinalização, determinando várias formas de resistência a este hormônio. Nos hepatócitos, por exemplo, a resistência à insulina é conhecida, porém, nem todos os percursos de sua sinalização são afetados da mesma forma (LECLERCQ et al., 2007).

Ainda nos hepatócitos, a via PKB/Akt, que controla a gliconeogênese e a glicogenólise, está severamente afetada nos estados de resistência à insulina, levando a uma perda no controle da saída de glicose, causa da hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória. No entanto, a síntese hepática de ácido graxo,

amplamente controlada pelo fator de transcrição SREBP-1c, não parece estar reduzida nos estados de resistência à insulina, devido à hiperinsulinemia compensatória, podendo até mesmo estar estimulada (LECLERCQ et al., 2007).

ESTEATOSE HEPÁTICA vs SÍNDROME METABÓLICA

A SM, também conhecida como a síndrome da resistência à insulina, é caracterizada pela coexistência variável de obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão. Outros achados incluem estado pró-inflamatório, microalbuminúria e hipercoagulabilidade (MINAME; CHACRA, 2005).

A prevalência da SM é estimada entre 20 e 25% da população geral, com comportamento crescente nas últimas décadas. Esta prevalência é ainda maior entre homens e mulheres à medida que a idade avança, chegando a 42% entre indivíduos com mais de 60 anos (RIBEIRO FILHO et al., 2006).

A patogênese da síndrome é multifatorial, sendo a obesidade, a vida sedentária, a dieta e as interações com fatores genéticos os responsáveis pelo seu aparecimento. Mutações e polimorfismos nos genes associados com a resistência à insulina, anormalidades nos adipócitos, hipertensão e alterações lipídicas ocupam papel central na etiopatogenia da síndrome (MINAME; CHACRA, 2005).

Como principal alteração na SM tem-se a dislipidemia, caracterizada por aumento dos AGL e dos TAG, redução dos valores de HDL-colesterol e aumento das concentrações de apolipoproteína-B circulantes (MINAME; CHACRA, 2005). Assim como a dislipidemia, anormalidades metabólicas associadas com a resistência à insulina, tal como tolerância anormal à glicose, são freqüentes em indivíduos portadores da DFGNA (GARG; MISRA, 2002).

A associação entre a SM e a DFGNA pode ter como um dos mecanismos etiopatogênicos a dislipidemia; a transferência de lipídios entre as lipoproteínas pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), por exemplo, encontra-se aumentada em indivíduos obesos, que freqüentemente apresentam ambas as condições clínicas. De acordo com Miname e Chacra (2005), a maior atividade da CETP ocasiona a transferência de éster de colesterol da HDL e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) para a VLDL e os quilomícrons, em troca de TAG. As partículas de HDL ricas em TAG, após ação da CETP, sofrem hidrólise pela lipase hepática, tornando-se menores e com depuração plasmática mais rápida. De forma semelhante, as partículas de LDL também sofrem lipólise pela lipase hepática, tornando-se pequenas e densas. Com isso, tem-se uma diminuição dos níveis plasmáticos das duas lipoproteínas, maior expressão de partículas aterogênicas (LDL pequenas e densas) e maior aporte de TAG para os hepatócitos.

Embora a obesidade total esteja claramente relacionada com a SM e a DFGNA, a distribuição da gordura corporal parece ter um papel importante na patogênese dessas alterações (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006). O tecido adiposo abdominal possui adipócitos hipertrofiados responsáveis pela secreção aumentada de adipocinas, que estão relacionadas à resistência à insulina. A alteração primária é, provavelmente, a incapacidade desse tecido em produzir TAG a partir de AGL, por esterificação inadequada. Outra alteração facilitada pela resistência à insulina é a falha dos adipócitos em reter AGL em seu interior, aumentando seu fluxo para a circulação (MINAME; CHACRA, 2005).

A última alteração apontada estabelece mais uma associação entre dislipidemia e DFGNA, pois, durante a resistência à insulina, o fígado processa a

quantidade em excesso de AGL provenientes da circulação, através de sua oxidação ou incorporação em partículas de VLDL secretadas para o plasma, promovendo hipertrigliceridemia. Tal processamento pode falhar com o contínuo fluxo de AGL, ocasionando acúmulo de gordura intra-hepática.

O comportamento metabólico da gordura intra-abdominal difere, ainda, daquele apresentado pelo tecido adiposo de outros locais, pela maior susceptibilidade à lipólise, em função do maior número de receptores glicocorticóides, pela maior sensibilidade a catecolaminas e pela menor expressão de IRS-1 (RIBEIRO FILHO et al., 2006). Tal comportamento parece desempenhar papel importante na gênese da resistência à insulina, tanto no fígado quanto nos tecidos periféricos, por proporcionar contínuo fornecimento de AGL para a circulação.

Adicionalmente, o tecido adiposo visceral secreta maiores concentrações de adipocinas pró-inflamatórias, como resistina, angiotensina I, inibidor de plasminogênio ativado-I, proteína C reativa e interleucina-6, que o tecido adiposo subcutâneo abdominal e o glúteo-femural (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). Como discutido anteriormente, as adipocinas ligadas a processos inflamatórios estão também comprometidas com a regulação metabólica; suas concentrações estão aumentadas em indivíduos obesos, podendo contribuir, direta ou indiretamente, com a gênese da resistência à insulina.

A lipólise da gordura abdominal é de especial importância na patogenia da DFGNA. Há dados demonstrando que aproximadamente dois terços da gordura acumulada no fígado de portadores da DFGNA provêm dos AGL circulantes e que a gravidade da esteatose hepática se correlaciona com a quantidade de tecido

adiposo visceral e não com a gordura subcutânea ou periférica (SOLÍS et al., 2006).

No entanto, deve-se considerar que, apesar da lipólise por adipócito no tecido adiposo subcutâneo ser menor que no tecido adiposo visceral, a gordura subcutânea, por ser mais volumosa, contribui em maior proporção que a gordura intra-abdominal para a circulação de AGL (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006). Assim, apesar do tecido adiposo intra-abdominal ser reconhecido pela sua associação com a DFGNA, a massa gordurosa corpórea total pode ser um importante preditor da sensibilidade insulínica hepática.

Em um estudo com pacientes portadores da DFGNA, cinco homens e quatro mulheres, do total de TAG acumulados no fígado, $59,0\% \pm 9,9$ eram derivados dos AGL circulantes, em sua maioria de fontes não esplânicas, $26,1\% \pm 6,7$, da lipogênese *de novo* e $14,9\% \pm 7,0$, da dieta (DONNELLY et al., 2005). Em outro estudo, com indivíduos magros saudáveis durante o período pós-absortivo, somente cerca de 15% do fluxo sistêmico de AGL foi proveniente da gordura visceral, enquanto que 75% derivou da extremidade superior do corpo e somente 10% das extremidades baixas (JENSEN; JOHNSON, 1996). Dessa forma, o tecido adiposo subcutâneo pode representar um papel tão importante quanto o visceral na relação entre a adiposidade central, resistência à insulina e outros componentes da síndrome metabólica (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

A presente discussão sugere que o aumento dos depósitos de gordura pode causar prejuízos ao metabolismo de carboidratos e lipídios, bem como produção exacerbada de fatores potencializadores da síndrome metabólica. Dentre esses fatores, destaca-se o aumento de AGL, o elo entre a resistência à

insulina, a dislipidemia e o desenvolvimento da esteatose hepática, componente hepático da síndrome metabólica.

CONCLUSÃO

A esteatose hepática tem sido associada à resistência à insulina e aos diversos componentes da síndrome metabólica. Na gênese das alterações hemodinâmicas e metabólicas associadas à síndrome, o metabolismo do tecido adiposo parece desempenhar papel central, pois o depósito aumentado de gordura no tecido adiposo intra-peritoneal e sua drenagem venosa no sistema portal, levaria a uma alta concentração de AGL e glicerol circulantes, afetando o metabolismo hepático. Como consequência, sobreviria a diminuição da sensibilidade à insulina neste órgão, com aumento da produção hepática de glicose, redução do *clearance* hepático de insulina, com posterior hiperinsulinemia, e esteatose hepática.

REFERÊNCIAS

1. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Valles V, Ríos-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepúlveda J. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. **Arch Med Res**, 2004 jan-feb; 35(1): 76-81.
2. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**. 2006 Feb;87(1):1-16.
3. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR. The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. **Annu Rev Nutr**. 2000; 20:663-97.
4. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**. 2004 Jul; 114(2):147-52.
5. Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. In: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. **Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005: 168-180.

6. Cesaretti MLR, Júnior OK. Modelos experimentais de resistência à insulina e a obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2006; 50(2):190-197.
7. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, LiN R, SamarasinQhe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association the insulin resistance syndrome. **Hepatology.** 2002 Feb;35(2):373-9.
8. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology.** 1998 Apr; 114(4):842-5.
9. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** 2002 Oct; 16(5):663-78.
10. Den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004 Apr;24(4):644-9.
11. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Invest.** 2005 May;115(5):1343-51.
12. Eisenberg ML, Maker AV, Slezak LA, Nathan JD, Sritharan KC, Jena BP, Geibel JP, Andersen DK. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. **Cell Physiol Biochem.** 2005; 15(1-4):51-8.
13. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev.** 2004 Feb;5(1):27-42.
14. Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. **Diabetes Care.** 2003 Mar;26(3):575-81.
15. Garg A, Misra A. Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. **J Clin Endocrinol Metab.** 2002 Jul;87(7):3019-22.
16. Gayotto LCC, Vianna MR, Leitão RMC. **Fígado e Drogas: Doenças do Fígado e Vias Biliares.** 1ºed. São Paulo: Atheneu; 2001. p.713-749.
17. Girman CJ, Rhodes T, Mercuri M, Pyörälä K, Kjekshus J, Pedersen TR, Beere PA, Gotto AM, Clearfield M; 4S Group and the AFCAPS/TexCAPS Research Group. The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). **Am J Cardiol.** 2004 Jan 15;93(2):136.

18. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**. 2001 Nov 16; 288(5):1102-7.
19. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2004;48:803-11.
20. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K; DECODE Study Group. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic european men in women. **Arch Intern Med**. 2004 May 24; 164(10):1066-76.
21. International Diabetes Federation (IDF). **The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome**. IDF Communications, Belgium. 2006.
22. Jensen MD, Johnson CM. Contribution of leg and splanchnic free fatty acid (FFA) kinetics to postabsorptive FFA flux in men and women. **Metabolism**. 1996 May;45(5):662-6.
23. Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2002 Oct;16(5):679-90.
24. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2008 Jan; 28(1):27-38.
25. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**. 2002 Dec 4;288(21):2709-16.
26. Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **J Hepatol**. 2007 Jul;47(1):142-56.
27. Machado UF, Shaan BD, Seraphim PP. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2006; 50(2):177-89.
28. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate A, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **Am J Med**. 1999 Nov; 107(5):450-5.
29. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. 1999 Jun;116(6):1413-9.

30. Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia NC, Villa AR, Sanchez-Lara K, Zamora-Valdes D, Ramos MH, Uribe M. Adiponectin as a protective factor in hepatic steatosis. **World J Gastroenterol**. 2005 Mar 28; 11(12):1737-41.
31. Miname MH, Chacra AP. Síndrome Metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**. 2005;15:482-9.
32. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. **Diabetes**. 1996 Jul; 45(7):881-5.
33. Oh JY, Hong YS, Sung YA, Barrett-Connor E. Prevalence and factor analysis of metabolic syndrome in an urban Korean population. **Diabetes Care**. 2004 Aug;27(8):2027-32.
34. Papa PC, Vargas AM, Silva JL, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**. 2002 Sep; 71(16):1917-28.
35. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. **J Biol Chem**. 2000 Dec 15;275(50):38990-4.
36. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**. 2007 Jul 14; 13(26):3540-53.
37. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2006 Apr;50(2):230-38.
38. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. **J Lipid Res**. 2006 Oct; 47(10):2280-90.
39. Santos CR, Portella ES, Avila SS, Soares EA. Identificação da síndrome metabólica em diabéticos tipo dois atendidos em Hospital Universitário do Rio de Janeiro. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**. 2003; 13(2 Edição Especial):98.
40. Scheen AJ, Luyckx FH. Obesity and liver disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2002 Dec; 16(4):703-16.
41. Sethi JK, Xu H, Uysal KT, Wiesbrock SM, Scheja L, Hotamisligil GS. Characterisation of receptor-specific TNFalpha functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. **FEBS Lett**. 2000 Mar 3;469(1):77-82.

42. Solís Herruzo JA, García Ruiz I, Pérez Carreras M, Muñoz Yagüe MT. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. **Rev Esp Enferm Dig.** 2006 Nov; 98(11):844-74.
43. Tavares MCN. Estudo da prevalência da síndrome metabólica em uma população urbana [Dissertação]. Maceió (AL): **Instituto de pesquisa, capacitação e especialização**; 2005.
44. Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Endocrinol Metab.** 2006 Dec; 1(12):4753-61.
45. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature.** 1997 Oct 9; 389(6651):610-4.
46. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. **J Gastroenterol Hepatol.** 2007 Sep; 22(9):1526-33.
47. Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.** 2004 jul/aug; 14(4):574-583.
48. Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. **Semin Liver Dis.** 2004 Feb; 24(1):99-106.
49. Weickert MO, Pfeiffer AF. Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism. **Diabetologia.** 2006 Aug; 49(8):1732-41.
50. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. **Science.** 1992 Nov 6; 258(5084):999-1001.
51. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab.** 2001 May; 86(5):1930-5.

2º artigo: artigo de resultados

SANTOS, JCF; ATAIDE, TR; OLIVEIRA, SL; BARBOSA, JHP; CABRAL JR., CR;
VERAS, KMA; LEITE, FMB; ANTUNES, RT; GOMES, TKC; BALWANI, MCLV.
Repercussões hepáticas da dieta AIN 93 em ratos *Wistar*.

RESUMO

Introdução: a dieta destaca-se entre os diversos fatores que determinam a resposta animal, em um contexto experimental. Vários relatos têm associado a ocorrência de alterações fisiológicas ao uso de dietas padrão.

Objetivo: avaliar as repercussões hepáticas do consumo da dieta AIN-93, em ratos *Wistar*.

Metodologia: quarenta ratos *Wistar* recém-desmamados foram divididos em 4 grupos, conforme o tipo e o tempo de exposição às dietas: AIN-93 1 mês (AIN-93 1m), AIN-93 4 meses (AIN-93 4m), Nuvilab® 1 mês (NUV 1m) e Nuvilab® 4 meses (NUV 4m), com livre acesso à ração e à água. Para o estudo, avaliaram-se o peso do animal e do fígado, a histologia do órgão, marcadores de função (albumina e proteínas totais séricas) e lesão (γ -GT, ALP, ALT e AST) hepáticas, glicemia e o lipidograma.

Resultados: a esteatose hepática foi encontrada em 90,0% dos animais do grupo AIN-93 1m e 100,0% dos animais AIN-93 4m, contra, apenas, 20,0% dos animais do grupo NUV 4m. Os animais do grupo NUV 1m não apresentaram esteatose. Os animais do grupo AIN-93 1m apresentaram 75,0% dos casos graves observados, graus 4 e 5, enquanto aqueles do grupo AIN-93 4m, 25,0%, contra nenhum caso grave nos animais dos grupos Nuvilab®. O peso absoluto do fígado dos animais do grupo AIN-93 1m foi menor que o do grupo AIN-93 4m, similar ao do grupo NUV 4m e superior ao do grupo NUV 1m. O peso relativo do órgão não diferiu entre os animais de mesma idade; o do grupo AIN-93 1m foi superior ao dos grupos AIN-93 4m e NUV 4m e, o dos animais do grupo NUV 1m, mais elevado que o do grupo NUV 4m, não diferindo dos demais. A glicemia do grupo AIN-93 1m foi maior que a dos grupos AIN-93 4m e NUV 4m, e similar àquela apresentada pelo grupo NUV 1m. Os níveis séricos de proteínas totais foram mais elevados no grupo AIN-93 4m que nos grupos AIN-93 1m e NUV 1m e maiores no grupo NUV 4m que no grupo NUV 1m. Resultados semelhantes foram observados para os níveis de albumina sérica, com exceção dos animais dos grupos Nuvilab®, que não diferiram entre si. Os níveis séricos de ALT e ALP foram menores no grupo AIN-93 1m, que no grupo NUV 4m. Para os demais marcadores, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados.

Conclusão: a dieta AIN-93 induziu esteatose hepática em ratos *Wistar*. Os casos mais graves foram observados no grupo de animais submetidos ao menor tempo de exposição à dieta, configurando-se um quadro agudo. A composição da dieta e/ou possíveis alterações durante o seu preparo, revestiram-se de particular importância na discussão do quadro observado.

Palavras-chave: esteatose hepática, dieta AIN-93, ratos *Wistar*.

ABSTRACT

Introduction: the diet is prominent among the many factors that determine the animal response in an experimental context. Various reports have associated the occurrence of physiological changes with the use of standard diets.

Objective: to evaluate the hepatic repercussions of the consumption of the diet, AIN-93 in Wistar rats.

Method: 40 newly weaned *Wistar* rats were allocated into 4 groups, according to the type and duration of exposure to diets: AIN-93 1 month (AIN-93 1m), AIN-93 4 months (AIN-93 4m), Nuvilab® 1 month (NUV 1m) and Nuvilab® 4 months (NUV 4m), with free access to diets and water. For the study, the weight of the animal and of the liver, histology of the organ, tests for liver function (albumin and total serum protein) and for hepatic lesions (γ -GT, ALP, ALT and AST), glycemia and the lipidogram were evaluated.

Results: hepatic steatosis was found in 90.0% of the animals in the AIN-93 1m group and 100.0% of the animals in AIN-93 4m, as against only 20.0% of the animals in the NUV 4m group. The animals in the group NUV 1m did not present steatosis. 75% of the severe cases observed, stages 4 and 5, were in the AIN-93 1m group and the others 25% were found in AIN-93 4m, with no severe cases found in the NUV groups. The absolute liver weight of the animals in the AIN-93 1m group was less than those in AIN-93 4m, similar to the NUV 4m, and greater than the NUV 1m. The relative weight of the organ did not differ between animals in the same age groups; in AIN-93 1m it was greater than in groups AIN-93 4m and NUV 4m, and in the group NUV1m it was greater than in NUV4m, not differing from the others. Glycemia was greater in the group AIN-93 1m than in groups AIN-93 4m and NUV 4m and was similar to that presented by the group NUV 1m. Serum levels of total protein were higher in the group AIN-93 4m than in groups AIN-93 1m and NUV 1m and were higher in the group NUV 4m than in group NUV 1m. Similar results were observed for the levels of serum albumin, with the exception of the animals in the Nuvilab® groups, which did not differ among themselves. The serum level of ALT was lower in group AIN-93 1m than in the group NUV 4m. For the other markers, no differences were seen between the groups.

Conclusion: the AIN93 diet induces hepatic steatosis in *Wistar* rats. The most serious cases were observed in the group of animals subjected to the lowest time of exposure to the diet, setting up an acute picture. The composition of the diet and/or possible amendments during its preparation, are of particular importance in the discussion of the observed context.

Key words: hepatic steatosis, AIN-93 diet, *Wistar* rats.

(I) INTRODUÇÃO

A utilização de animais de laboratório em pesquisas biológicas é particularmente vantajosa, porque permite o controle de uma série de variáveis que, no ser humano, quando possível, apresentariam elevado grau de dificuldade.

Uma importante variável a ser considerada na manutenção dos animais é a nutrição adequada, pois os potenciais genéticos de crescimento, reprodução, longevidade e de resposta a estímulos dependem muito das condições alimentares (MEZADRI, 2004). Adicionalmente, a dieta é um dos mais importantes fatores ambientais a influenciar o surgimento de doenças associadas ao envelhecimento, em roedores (RAO; MORRIS; SEELY, 2001; DUFFY et al., 2002). Observações de que dietas padrão podem influenciar a resposta de roedores a substâncias químicas ou outros fatores em estudo têm atraído grande interesse (NEWBERNE; FOX, 1980).

Para animais de laboratório, as dietas são colocadas em três categorias. Na primeira, inclui-se uma dieta não refinada ou não purificada, à base de cereais, cujos ingredientes primários são fornecidos por alimentos *in natura*, em fórmulas abertas ou fechadas. A segunda categoria é composta por dieta purificada. Esta é elaborada com ingredientes refinados, incluindo isolado protéico, açúcares e óleos refinados e fontes purificadas de vitaminas e minerais. Na terceira categoria, tem-se a dieta quimicamente definida, composta por fontes puras de aminoácidos, mono ou dissacarídeos e ácidos graxos purificados ou triacilgliceróis (TAG). Minerais e vitaminas são fornecidos por misturas da mais alta pureza (REEVES, 1997).

Existem diferentes dietas padrão em uso na pesquisa científica, concebidas por instituições de pesquisa ou formuladas por indústrias agropecuárias. Apesar

de utilizadas indiscriminadamente, as suas composições exibem diferenças que podem induzir efeitos metabólicos distintos, introduzindo uma variável não controlada, que pode comprometer a interpretação e a comparação de resultados obtidos por diversos estudos.

O *American Institute of Nutrition* (AIN), no período entre 1977 e 1980, publicou uma fórmula de dieta purificada para roedores, AIN-76 e, posteriormente, AIN-76A, adotada como dieta padrão em diversos estudos. Esta dieta foi utilizada durante anos na sua formulação original, ou com modificações previstas em protocolos experimentais. No entanto, foram descobertos numerosos problemas com o seu uso, como hiperlipidemia e lesões hepáticas, notadamente esteatose (MEDINSKY et al., 1982; REEVES; 1997). Daí surgiu a dieta AIN-93, uma versão reformulada da dieta AIN-76A, que teve como objetivo evitar os problemas advindos da antiga versão e prover uma melhoria no desempenho dos animais de experimentação. A nova dieta veio em duas versões: AIN-93G, para ser usada durante as fases de crescimento e reprodução, e AIN-93M, para ser usada durante a manutenção do animal adulto.

A esteatose hepática (EH), definida pela Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado como um acúmulo de gordura hepática que excede 5-10% do peso do órgão, ou como uma dada porcentagem de hepatócitos carregados de gordura, observados à microscopia ótica (FESTI et al., 2004), faz parte do conjunto de alterações que caracterizam a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA), termo clínico-patológico que abrange desde a própria esteatose à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose, cirrose e, como última consequência, carcinoma hepatocelular (BROWNING; HORTON, 2004; FESTI et al., 2004).

A fisiopatologia da DFGNA é complexa; dados sugerem que diversos fatores ambientais como dieta, exercício e/ou toxinas podem ser determinantes da sua causa (COTRIM et al., 1999; QURESHI; ABRAMS, 2007). Tem-se sugerido, ainda, que a resistência à insulina, associada à síndrome metabólica (SM), frequentemente observada em indivíduos com sobrepeso e obesidade, é um requerimento essencial para o acúmulo de gordura no hepatócito (CHITTURI et al., 2002; MARCHESINI et al., 1999).

Está se tornando cada vez mais evidente que a EH não é uma entidade puramente benigna, de bom prognóstico. O fígado gorduroso é mais vulnerável a agentes oxidantes, aumentando o risco de desenvolvimento de esteato-hepatite e a progressão para fibrose e cirrose. No entanto, estima-se que apenas 3% dos casos evoluem para quadros graves, enquanto que a EHNA evolui para cirrose, em 15 a 25% dos casos (MATTEONI et al., 1999; CALDWELL; DAY, 2002; KOTEISH E DIEHL, 2002).

O presente grupo de investigação tem observado EH em ratos alimentados com a dieta AIN-93, em diferentes contextos (ATAIDE et al. *in press*; LUCENA, 2007), sugerindo problemas em sua composição, possivelmente no tocante à proporção de macronutrientes e à quantidade adicionada de aminoácidos sulfurados e colina, reconhecido fator lipotrófico.

Em virtude da repercussão da composição da dieta sobre a instalação do quadro de EH, dos resultados prévios observados pelo presente grupo de investigação e da relevância de estudos que promovam a avaliação de dietas padrão utilizadas em experimentação animal, o objetivo desse trabalho foi avaliar as repercussões hepáticas do consumo da dieta padrão AIN-93, em ratos *Wistar*.

(II) MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número 009428/2006-62, baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal – UNESCO - 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

Delineamento experimental

Este estudo foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 2, onde o Fator A foi composto por duas dietas (AIN-93 e Nuvilab®) e o Fator B, por dois tempos de exposição às mesmas (30 e 120 dias), perfazendo quatro tratamentos e 10 repetições.

Animais de experimentação e tratamento dietético

Quarenta ratos machos *Wistar* recém desmamados, aos vinte e um dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFAL (BIOCEN), foram divididos em quatro grupos ($n=10$), segundo o tipo de dieta recebida e o tempo de exposição à mesma: AIN-93 1 mês (AIN-93 1m), AIN-93 4 meses (AIN-93 4m), Nuvilab® 1 mês (NUV 1m) e Nuvilab® 4 meses (NUV 4m).

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição com temperatura ambiente (20 - 24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) controladas, recebendo água e dieta *ad libitum*. Nos primeiros trinta dias, foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais; após este período, os animais dos grupos AIN-93 4m e NUV 4m foram distribuídos em gaiolas de polietileno, em número de quatro animais por gaiola, de acordo com o grupo, até o quarto mês de estudo.

A ingestão dietética e o peso dos animais foram registrados semanalmente, até o final do primeiro mês de experimento. Do desmame até o final do segundo mês de vida, os animais do grupo AIN-93 4m receberam a dieta AIN-93 G (*Growth*, crescimento); a partir do terceiro mês até o sacrifício, os animais receberam a dieta AIN-93 M (*Maintenance*, manutenção). Os animais do grupo AIN-93 1m, por sua vez, receberam apenas a dieta AIN-93 G.

Para efeito de avaliação das condições higiênico-sanitárias do biotério de pesquisa e monitoração da saúde dos animais, foram realizados exames parasitológicos de fezes, através do método HPJ de Hoffman et al. (1934).

Preparação das dietas

A Tabela 1 apresenta a composição da dieta AIN-93 (REEVES, 1997), nas versões G e M. O conteúdo de sacarose da dieta original (10%) foi substituído por amido de milho.

O óleo de soja e o amido de milho foram adquiridos no comércio local. Os demais ingredientes foram fornecidos pela RHOSTER Indústria e Comércio Ltda., São Paulo.

A dieta foi elaborada no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Nutrição da UFAL. Acrescentou-se água destilada à mistura dos ingredientes para formar uma massa homogênea que, em seguida, foi cortada e seca em estufa de circulação de ar a 60°C, por 24 horas. A dieta foi oferecida sob a forma de *pellets*, após um período máximo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

A dieta comercial Nuvilab® (Tabela 2) foi fornecida pelo Biotério Central da UFAL e armazenada conforme recomendações do fabricante.

Tabela 1 – Composição da dieta AIN-93 nas versões G e M¹

COMPOSIÇÃO	G	M
Total de energia (Kcal/kg) [▲]	3.828	3.719
Proteína (%) [•]	17,8	12,8
Carboidratos (%) [•]	65,8	77,5
Lipídios (%) [•]	16,4	9,7
Caseína (>85% proteína; g/kg)	200	140
Amido de milho (g/kg)	497,50	565,70
Amido dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos; g/kg)	132	155
Óleo de soja (g/kg)	70	40
Celulose microcristalina (g/kg)	50	50
Mistura mineral AIN-93 G (g/kg)	35	-
Mistura mineral AIN-93 M (g/kg)	-	35
Mistura vitamínica (g/kg)	10	10
L-cistina (g/kg)	3	1,8
L-metionina (g/kg)	1,6	-
Bitartarato de colina (41,1% colina; g/kg)	2,5	2,5
t-butildidroquinona (g/kg)	0,014	0,008

¹Conforme Reeves (1997). [▲]Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

[•]Percentual do total de energia

Tabela 2 – Composição da dieta comercial Nuvilab®

COMPOSIÇÃO	
Total de energia (Kcal/kg) [▲]	3000
Proteína (%) [•]	29,3
Carboidratos (%) [•]	57,2
Lipídios (%) [•]	13,5
Umidade (máx)	12,5%
Proteína Bruta (min)	22,0%
Extrato Etéreo (min)	4,5%
Matéria Mineral (máx)	10,0%
Matéria Fibrosa (máx)	8,0%
Cálcio (máx)	1,4%
Fósforo (min)	0,8%
Lisina	100,0mg
Metionina	300,0mg
Antioxidante	100,0mg

[▲]Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

[•]Percentual do total de energia

Análises bioquímicas

Ao final do período de exposição às dietas, os animais foram mantidos em jejum noturno, anestesiados por inalação de éter etílico e submetidos à coleta de sangue do plexo vascular retro-orbital, com auxílio de tubo capilar para micro-hematócrito.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado, a 3500 x g, por 10 minutos, e o soro obtido processado em um laboratório de análises clínicas, na cidade de Maceió-AL. Foram determinadas as concentrações séricas de: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), ALP (fosfatase alcalina), γ -GT (gama-glutamil transferase), proteínas totais, albumina, triacilgliceróis, colesterol total e frações: colesterol HDL (HDL-c, *high-density lipoprotein cholesterol*), colesterol VLDL (VLDL-c, *very low-density lipoprotein cholesterol*) e colesterol LDL (LDL-c, *low-density lipoprotein cholesterol*), e glicose. As determinações de VLDL-c e de LDL-c foram estimadas pelas fórmulas de Friedewald et al. (1972):

$$VLDL-c = \text{triacilgliceróis} \div 5$$

$$LDL-c = \text{colesterol total} - \text{colesterol HDL-c} - \text{triacilgliceróis} \div 5$$

Sacrifício, dissecação e processamento do fígado

Após a coleta de sangue, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por secção da aorta torácica. Em seguida, procedeu-se a abertura completa da cavidade abdominal e a retirada do fígado, o qual foi pesado e o lobo maior, lobo esquerdo, seccionado no seu maior diâmetro. O fragmento do órgão foi imerso em solução de formol a 10%, para fixação. A porção remanescente foi

pesada, seccionada em três partes, congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer a -70°C , para análises posteriores.

Análise histológica do fígado

Depois de fixado, o fragmento do fígado foi clivado transversalmente e levado ao Setor de Patologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, para o processamento, inclusão em parafina e coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) de rotina. Alterações macroscópicas, quando presentes, foram igualmente consideradas para análise histológica. Para fins de estadiamento, a EH foi classificada em cinco graus, 0, 1, 2, 3, 4 e 5, de acordo com as características histológicas apresentadas na Figura 1.

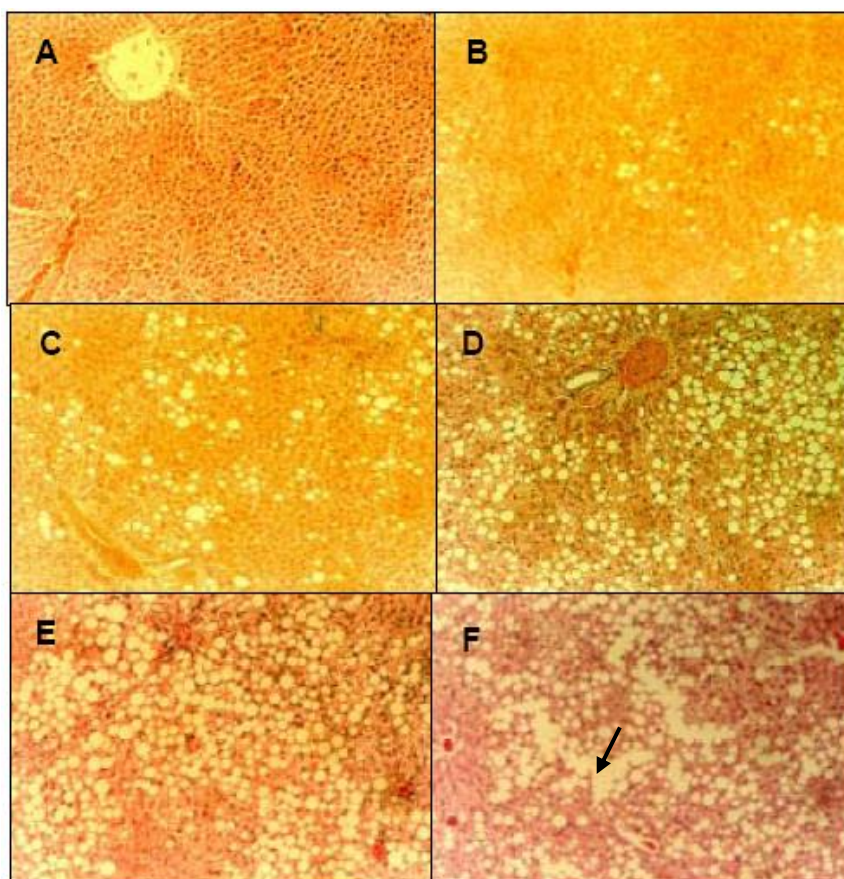


Figura 1 - Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose grau 0- ausência (A), grau 1- leve (B), grau 2- levemente moderado (C), grau 3- moderado (D), grau 4- grave (E) e grau 5- grave com presença de pseudocistos (seta) (F). Fonte: Ataíde et al. (*in press*).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva para obtenção de médias e desvios-padrão. Após verificação dos pressupostos de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Levene), realizaram-se a análise de variância pelo teste F e, posteriormente, o teste Tukey-HSD (*Honestly significant difference*), para comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos.

Para a variável esteatose hepática foram realizados os testes Exato de Fisher, Cramer-V, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, correlação linear de Spearman (r) e Nemenie. Para o estadiamento da EH, foram realizados os testes de χ^2 , Cramer-V, Kruskal-Wallis, correlação linear de Pearson (r) e Nemenie. Em todos os casos optou-se por um nível de significância menor que 5,0% de probabilidade de erro experimental.

(III) RESULTADOS

Um achado histológico importante apresentado principalmente pelos animais alimentados com a dieta AIN-93 foi a esteatose hepática, em 90,0% dos animais do grupo AIN-93 1m e 100,0% dos animais AIN-93 4m, contra, apenas, 20,0% dos animais do grupo NUV 4m. Os animais do grupo NUV 1m não apresentaram EH.

Observaram-se, para o número de casos de EH, diferença significativa e forte associação ($p < 0,01$), respectivamente, pelos testes Exato de Fisher e Cramer-V ($r = 0,843$), em relação às dietas AIN-93 e comercial Nuvilab®, independente do tempo de exposição às mesmas (1 mês e 4 meses). A dieta AIN-93 promoveu maior número de casos de EH que a ração comercial Nuvilab®, pelo teste de Mann-Whitney ($U = 28,00$; $p < 0,01$). Adicionalmente, observou-se diferença

significativa entre os escores médios dos quatro grupos avaliados, obtidos pela estatística de Kruskal-Wallis (Tabela 3). A frequência observada de EH nos grupos AIN-93 1m e 4m foi significativamente maior que a dos grupos NUV 1m e 4m, pelo teste de Nemenie ($p < 0,01$).

Tabela 3 – Frequência de esteatose hepática (EH), graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), peso absoluto (PAF) e peso relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, NUV 1m e NUV 4m

VARIÁVEIS	GRUPOS ($n=10$)			
	AIN-93 1m	AIN-93 4m	NUV 1m	NUV 4m
EH ¹ (%)	90,00 ^a	100,00 ^a	0,00 ^b	20,00 ^b
GEH ¹	2,67 ^a	2,10 ^a	0,00 ^b	0,20 ^b
PCF ² (g)	152,94±10,35 ^a	285,42±12,68 ^b	132,77±17,92 ^a	261,34±8,96 ^b
PAF ² (g)	6,55±1,48 ^a	8,07±1,28 ^b	4,19±1,08 ^c	6,98±0,52 ^{a,b}
PRF ^{2,3}	0,048±0,002 ^a	0,030±0,002 ^{b,c}	0,039±0,003 ^{a,b}	0,026±0,002 ^c

¹Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pela estatística de Kruskal-Wallis e teste de Nemenie ($p < 0,001$).

²Valores médios ± desvios-padrão. Valores seguidos por pelo menos uma mesma letra na linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey-HSD.

³ Peso do fígado em relação ao peso corporal do animal.

Por outro lado, não foram observadas diferença significativa e associação ($p \geq 0,05$) de número de casos de EH, em relação ao fator tempo de exposição às dietas, pelos testes Exato de Fisher e Cramer-V.

Para o estadiamento da EH, observaram-se diferença significativa e forte associação ($p < 0,01$), respectivamente, pelos testes do χ^2 e Cramer-V ($r=0,870$), entre as duas dietas testadas. A análise de correlação linear de Pearson ($r=-0,753$; $p < 0,001$) sugere, ainda, que a dieta AIN-93 induziu maior grau de esteatose hepática nos animais, que a ração comercial Nuvilab®. Adicionalmente, observaram-se diferenças significativas entre as médias dos graus de EH (GEH) dos quatro grupos avaliados, obtidas pela estatística de Kruskal-Wallis (Tabela 3). Os animais dos grupos AIN-93 1m e AIN-93 4m apresentaram graus mais elevados que os demais, pelo teste de Nemenie ($p < 0,01$). Os animais do grupo

AIN-93 1m apresentaram 75,0% dos casos graves de EH observados, graus 4 e 5, enquanto que aqueles do grupo AIN-93 4m, 25,0%, contra nenhum caso grave nos animais alimentados com a dieta Nuvilab®.

Não foram observadas diferença, associação e correlação linear significativas ($p \geq 0,05$) do estadiamento da EH em relação ao fator tempo de exposição às dietas, pelos testes do χ^2 , Cramer-V e correlação linear de Pearson.

Em relação ao peso corporal final, conforme esperado, os animais mais velhos (grupos AIN-93 4m e NUV 4m) apresentaram médias mais elevadas que os animais mais jovens (grupos AIN-93 1m e NUV 1m), independentemente do tipo de dieta a que estavam submetidos ($p < 0,01$; Tabela 3).

Quanto ao peso absoluto do fígado, os animais do grupo AIN-93 1m apresentaram média inferior àquela do grupo AIN-93 4m ($p < 0,05$), porém similar à média do grupo NUV 4m ($p \geq 0,05$) e superior à do grupo NUV 1m ($p < 0,01$) (Tabela 3). O peso relativo do órgão, peso do fígado/peso corporal, no entanto, não diferiu significativamente entre os animais sob o mesmo tempo de exposição às dietas ($p \geq 0,05$). O peso relativo do fígado do grupo AIN-93 1m foi superior ao dos grupos AIN-93 4m ($p < 0,01$) e NUV 4m ($p < 0,01$). Os animais do grupo NUV 1m, por sua vez, apresentaram valor médio mais elevado que o grupo NUV 4m ($p < 0,05$), não diferindo dos demais ($p \geq 0,05$) (Tabela 3).

Em relação às variáveis bioquímicas (Tabela 4), a glicemia observada no grupo AIN-93 1m foi significativamente maior que as dos grupos AIN-93 4m e NUV 4m ($p < 0,05$), e similar àquela apresentada pelos animais submetidos ao mesmo tempo de exposição à dieta ($p \geq 0,05$; NUV 1m). Os níveis séricos de colesterol, triacilgliceróis, LDL-c, HDL-c, relação LDL-c/HDL-c e VLDL-c foram estatisticamente semelhantes ($p \geq 0,05$).

Tabela 4 – Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, NUV 1m e NUV 4m

VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	GRUPOS (n=10)			
	AIN-93 1m	AIN-93 4m	NUV 1m	NUV 4m
Glicemia (mg/dL)	182,33±21,56 ^a	48,00±26,41 ^b	82,00±37,34 ^{a,b}	68,75±18,67 ^b
Triacilgliceróis (mg/dL)	153,67±20,32 ^a	109,50±24,88 ^a	163,00±35,19 ^a	111,25±17,60 ^a
Colesterol total (mg/dL)	85,33±7,01 ^a	49,00±8,58 ^a	75,00±12,13 ^a	57,75±6,07 ^a
LDL-c (mg/dL)	21,93±4,88 ^a	7,40±5,98 ^a	23,40±8,46 ^a	11,50±4,23 ^a
HDL-c (mg/dL)	32,67±2,44 ^a	24,50±2,99 ^a	19,00±4,23 ^a	24,00±2,11 ^a
LDL-c/HDL-c	0,67±0,16 ^a	0,32±0,20 ^a	1,23±0,28 ^a	0,47±0,14 ^a
VLDL-c (mg/dL)	30,73±4,06 ^a	21,90±4,98 ^a	32,60±7,04 ^a	22,25±3,52 ^a
Proteínas totais (g/dL)	5,67±0,15 ^{a,c}	6,55±0,19 ^{b,d}	5,20±0,26 ^a	6,22±0,13 ^{c,d}
Albumina (g/dL)	1,33±0,07 ^a	1,75±0,09 ^b	1,20±0,12 ^a	1,50±0,06 ^{a,b}
ALT (U/L)	40,67±5,77 ^a	62,50±7,07 ^{a,b}	51,00±10,00 ^{a,b}	86,75±5,00 ^b
AST (U/L)	203,33±34,76 ^a	245,50±42,57 ^a	250,00±60,21 ^a	291,25±30,10 ^a
AST/ALT	5,11±0,60 ^a	3,89±0,73 ^a	4,90±1,03 ^a	3,45±0,52 ^a
ALP (U/L)	462,67±70,50 ^a	169,50±86,34 ^a	207,00±122,10 ^a	144,50±61,05 ^a
γ-GT (U/L)	2,00±0,26 ^a	1,50±0,32 ^a	2,00±0,46 ^a	1,25±0,23 ^a

Valores expressos em média ± desvios-padrão. Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra na linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey-HSD.

Os níveis séricos de proteínas totais foram significativamente maiores nos animais do grupo AIN-93 4m, que nos animais dos grupos AIN-93 1m e NUV 1m ($p < 0,05$). Os animais dos grupos Nuvilab® 1 m e 4 m também diferiram entre si ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados para os níveis de albumina sérica, com exceção dos animais dos grupos Nuvilab®, que não diferiram significativamente ($p \geq 0,05$).

Dentre os marcadores de função e lesão hepáticas, observaram-se níveis séricos de ALT significativamente menores no grupo AIN-93 1m, em relação ao

grupo NUV 4m ($p < 0,01$). Para os demais marcadores, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados ($p \geq 0,05$).

Foram observadas correlação linear de Spearman (r) positiva entre EH e peso absoluto do fígado ($r=0,60$; $p < 0,01$), peso corporal final ($r=0,40$; $p < 0,05$), (Figura 2, A e B) e graus de EH ($r=0,92$; $p < 0,01$); e, correlação negativa entre ALT ($r=-0,54$; $p=0,01$) e AST ($r=-0,51$; $p < 0,01$) (Figura 2, C e D). Para o estadiamento da EH observaram-se correlação positiva com peso absoluto do fígado ($r=0,49$; $p < 0,01$) (Figura 2 E) e com glicemia ($r=0,35$; $p < 0,05$); e, correlação negativa com ALT ($r=-0,54$; $p < 0,01$) e com AST ($r=-0,55$; $p=0,01$).

Para o peso corporal final observaram-se correlação positiva com peso absoluto do fígado ($r=0,78$; $p < 0,01$) (Figura 2 F), níveis séricos de proteínas totais ($r=0,73$; $p < 0,01$), albumina sérica ($r=0,67$; $p < 0,01$) e ALT ($r=0,38$; $p < 0,05$); e, correlação negativa com glicemia ($r=-0,40$; $p < 0,05$), triacilgliceróis ($r=-0,48$, $p=0,01$), colesterol total ($r=-0,82$; $p < 0,01$), LDL-c ($r=-0,80$; $p < 0,01$), relação LDL-c/HDL-c ($r=-0,74$; $p < 0,01$), VLDL-c ($r=-0,48$; $p=0,01$), relação AST/ALT ($r=-0,58$; $p=0,01$), ALP ($r=-0,64$; $p < 0,01$) e γ -GT ($r=-0,54$; $p < 0,01$).

Observaram-se, ainda, correlação positiva entre peso absoluto do fígado e níveis séricos de proteínas totais ($r=0,54$; $p < 0,01$) e albumina sérica ($r=0,51$; $p < 0,01$); e, correlação negativa com triacilgliceróis ($r=-0,44$; $p < 0,05$), colesterol total ($r=-0,55$; $p=0,01$), LDL-c ($r=-0,56$; $p < 0,01$), relação LDL-c/HDL-c ($r=-0,53$; $p < 0,01$), VLDL-c ($r=-0,44$; $p < 0,05$), AST ($r=-0,58$; $p < 0,01$), relação AST/ALT ($r=-0,38$; $p < 0,05$) e γ -GT ($r=-0,57$; $p=0,01$).

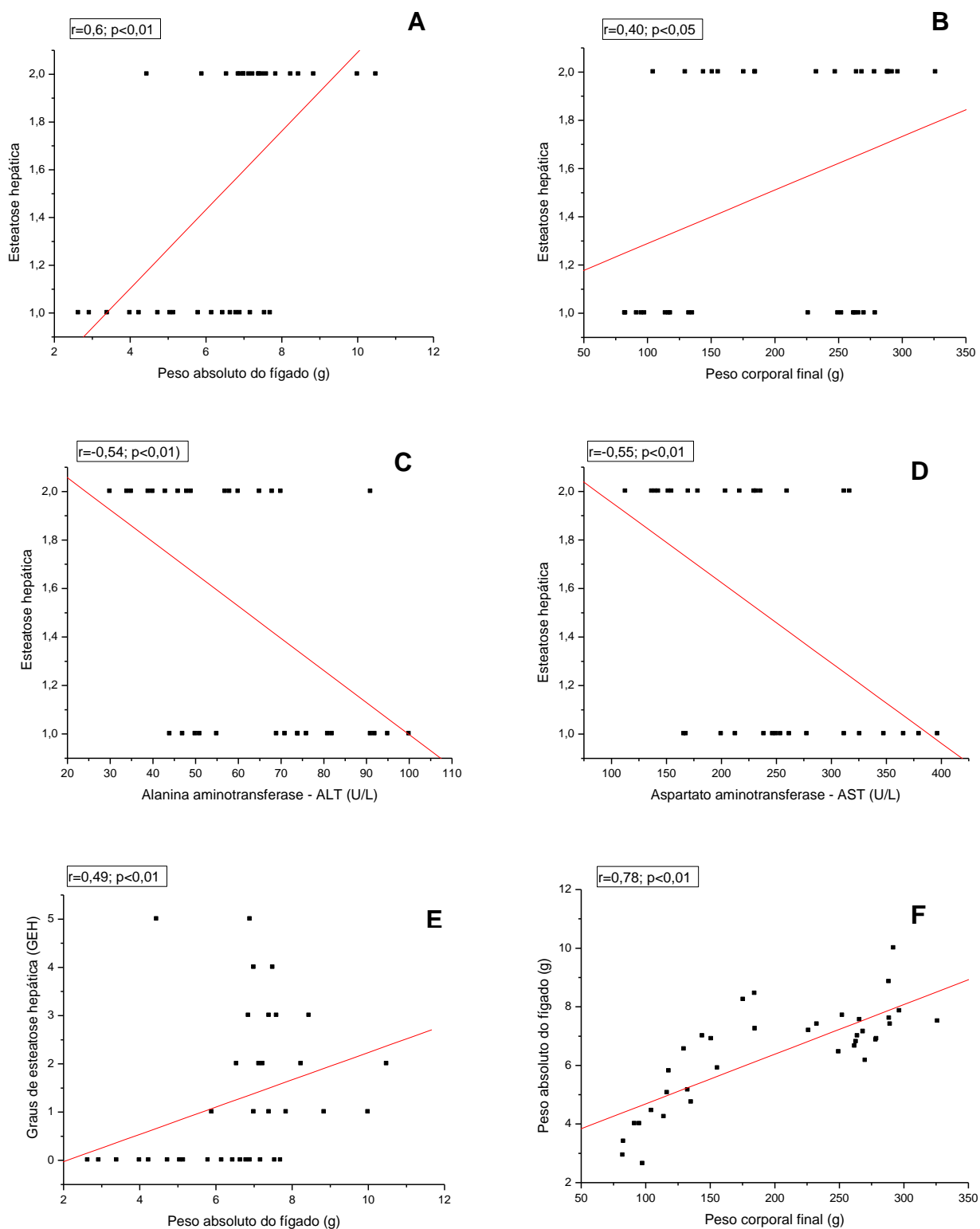


Figura 2 – Correlação linear de Spearman entre esteatose e peso absoluto do fígado (A), peso corporal final (B), alanina aminotransferase (C) e aspartato aminotransferase (D), e correlação linear de Pearson entre peso absoluto do fígado e peso corporal final (E) e entre graus de esteatose hepática e peso absoluto do fígado (F). Esteatose hepática: 1 – ausência, 2 – presença.

Encontraram-se correlação positiva entre peso relativo do fígado e glicemia ($r=0,63$; $p<0,01$), colesterol total ($r=0,69$; $p<0,01$), LDL-c ($r=0,58$; $p<0,01$), relação LDL-c/HDL-c ($r=0,48$; $p<0,05$), relação AST/ALT ($r=0,57$; $p=0,01$) e ALP ($r=0,77$; $p<0,01$); e, correlação negativa com níveis séricos de proteínas totais ($r=-0,60$; $p<0,01$), albumina ($r=-0,48$; $p<0,01$) e ALT ($r=-0,55$; $p=0,01$).

Para os marcadores de função e lesão hepáticas observaram-se correlação positiva entre os níveis séricos de proteínas totais e albumina sérica ($r=0,86$; $p<0,01$) e ALT ($r=0,49$; $p<0,01$); albumina sérica e ALT ($r=0,42$; $p<0,05$); ALT e AST ($r=0,40$; $p<0,05$); e, entre AST e γ -GT ($r=0,47$; $p=0,01$). E, correlação negativa entre proteínas totais e relação AST/ALT ($r=-0,44$; $p<0,05$) e ALP ($r=-0,43$; $p<0,05$); e, entre ALT e ALP ($r=-0,42$; $p<0,05$).

(IV) DISCUSSÃO

No presente estudo, a dieta AIN-93 peletizada induziu EH em ratos *Wistar*. A dieta, independentemente do tempo de exposição à mesma, foi a principal responsável pelo surgimento do quadro. Silva et al. (*in press*), ao observarem EH em ratos alimentados com a dieta AIN-93, sugerem que problemas relacionados à sua composição em macronutrientes, particularmente carboidratos e proteínas, em aminoácidos sulfurados ou agentes lipotróficos, possam ter contribuído para a instalação da infiltração gordurosa.

Medinsky et al. (1982), investigando a adequação da dieta AIN-76A para ratos Fischer-344, observaram EH nos animais. Os autores atribuíram o achado à elevada quantidade de sacarose presente na dieta. Na formulação AIN-76 e na AIN-76A, versão posterior, a sacarose é o carboidrato predominante (50%, contra 25% de amido de milho; g/kg de dieta). No entanto, efeitos adversos do uso excessivo deste açúcar foram observados, a exemplo de EH, hiperlipidemia

(MEDINSKY et al., 1982) e aumento dos requerimentos de cobre (FAILLA et al., 1988; FIELDS et al., 1983). Diante destes achados, os participantes do *workshop* do *American Institute of Nutrition*, de 1989, recomendaram mudanças em sua formulação, sugerindo que o conteúdo do açúcar fosse marcadamente reduzido e substituído por amido de milho, considerações introduzidas na versão AIN-93, que restringiu a sacarose a 10% (REEVES et al., 1993).

Apesar disso, no estudo de Lien (2001), foi encontrada EH de leve a moderada em ratos *Sprague-Dawley* CD, de ambos os sexos, alimentados com as dietas AIN-76A e AIN-93G; alterações leves também foram encontradas em ratos alimentados com dieta à base de cereais. A incidência e a severidade da EH foram maiores em ratos alimentados com a dieta AIN-93G e ratas alimentadas com a AIN-76A, quando comparados aos ratos alimentados com as dietas AIN-76A, às ratas alimentadas com a dieta AIN-93G e aos ratos de ambos os sexos alimentados com uma dieta à base de cereais. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo, onde os ratos alimentados com a dieta AIN-93G, grupo AIN-93 1m, apresentaram 75% dos casos graves de EH observados.

No presente estudo, as dietas AIN-93G e M foram elaboradas substituindo-se os 10% de sacarose por amido de milho; desta forma, o açúcar ficou restrito à quantidade fornecida pela mistura vitamínica. Apesar disso, observou-se EH, o que leva a supor que fatores outros, além do conteúdo em sacarose, contribuíram para o desenvolvimento do quadro.

O teor de carboidratos totais da dieta deve ser considerado, uma vez que seu excesso pode promover síntese hepática aumentada de AG (KANG et al., 2006). A restrição de carboidratos dietéticos constitui-se uma estratégia para o controle da EH; entretanto, não existem estudos conclusivos que determinem que

esta ação modifique a história natural da doença (ARROSPIDE, 2003). De um modo geral, a literatura parece indicar que a orientação quanto à qualidade das fontes dietéticas de carboidratos, mais do que à sua restrição ou ao aumento do consumo de fibras, deve ser priorizada para pessoas em situação de risco (LOZA et al., 2003).

Quanto ao teor de lipídios da dieta, Samuel et al. (2004) observaram que ratos alimentados por três dias com dieta rica em lipídios triplicaram seus níveis de TAG hepáticos. A similaridade na composição de lipídios entre o fígado e a dieta residiu na abundância de ácido graxo linoléico (18:2), sugerindo que a dieta também é fonte de gordura na EH. Gauthier (2006) levantou a hipótese de que o fígado age como um amortecedor sistêmico, aumentando seu percentual de lipídios na ingestão elevada de gorduras, em ratos. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento da EH está mais ligado à ingestão de lipídios do que ao ganho de peso corporal propriamente dito.

Ghibaudi et al. (2002) estabeleceram que dietas com baixo teor de lipídios, em geral, apresentam cerca de 10% das calorias provenientes deste macronutriente; com alto teor, cerca de 30-50% das calorias; e, com muito alto teor, geralmente acima de 50%. Dietas à base de cereais, por sua vez, contêm cerca de 10 a 12% das calorias totais provenientes dos lipídios. As dietas AIN-93 G e M apresentam, respectivamente, 16,4 e 9,7%, contra 13,5% fornecidos pela dieta Nuvilab®. Portanto, uma vez que nenhuma destas dietas pode ser considerada com alto teor de lipídios, este fator não deve ter contribuído para o surgimento da EH no presente estudo.

Outros autores observaram uma menor concentração de lipídios hepáticos associada à fonte protéica das dietas. Caligari et al. (2006), por exemplo,

concluíram que o metabolismo e o conteúdo hepático de lipídeos foi reduzido pela substituição da caseína por uma proteína de origem vegetal (*Lupinus albus*), em dietas isocalóricas oferecidas aos animais experimentais. Tachibana et al. (2005) relataram diferenças na expressão hepática de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na regulação energética, em ratos alimentados com proteína isolada de soja ou com caseína. No estudo de Rubio et al. (1999), por sua vez, foram evidenciados efeitos significativos no peso, composição e atividade enzimática do fígado dos animais alimentados com dietas baseadas em leguminosas. No conjunto, tais trabalhos sugerem que a qualidade protéica da dieta pode influenciar o metabolismo hepático e refletir em diferenças de composição dos tecidos, evidenciando um efeito redutor de dietas baseadas em proteínas de origem vegetal sobre a concentração de lipídeos hepáticos.

A diferença no conteúdo em fibras entre as dietas utilizadas é outro fator a ser considerado. Sabe-se que a fibra dietética, especialmente a fração solúvel presente em ingredientes da ração comercial, pode retardar a digestão e a absorção dos carboidratos, prevenindo aumentos abruptos na glicemia e insulinemia, associados à patogênese da esteatose hepática (LECLERCQ et al., 2007; WANG et al., 2007). Além disso, supõe-se que o grau de fermentação intestinal das fibras dietéticas e a conseqüente produção dos ácidos graxos de cadeia curta acetato, propionato e butirato possam também influenciar o metabolismo energético dos animais. Assim, uma diferença não apenas quantitativa, mas especialmente qualitativa seria capaz de causar diferentes respostas metabólicas nos roedores (ANDERSON et al., 1999; WANG et al., 2007). Em uma investigação na qual ratos foram alimentados com dietas baseadas na formulação AIN, similares em proporção de nutrientes, incluindo o

teor de fibras, mas contendo apenas celulose (de acordo com a fórmula original) ou uma mistura de fibras solúveis e insolúveis, verificou-se que o conteúdo hepático de colesterol foi significativamente maior nos animais alimentados com a dieta contendo apenas celulose. Segundo seus autores, a maior excreção fecal de gordura pelos animais que receberam a mistura de fibras justificaria tal achado (KRITCHEVSKY; TEPPER, 2005).

Outro fator dietético relacionado ao quadro de EH consiste na presença de substâncias lipotróficas, como a colina e a metionina. A colina é uma amina quaternária componente da fosfatidilcolina, o principal fosfolípido que compreende o revestimento exterior das partículas de VLDL, necessárias à exportação de AG do hepatócito, exercendo, dessa forma, ação lipotrófica. Sua deficiência promove o acúmulo hepático de TAG (ZEISEL, 2000; VETELAINEN et al., 2007).

A quarta revisão do *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (NRC, 1995) recomendou um aumento nas concentrações dietéticas de muitos nutrientes, incluindo colina e aminoácidos sulfurados. O requerimento estimado foi aumentado de 2,0g para 2,5g de bitartarato de colina e de 6,0g para 9,8g de aminoácidos sulfurados, por quilo de dieta. Para alcançar o novo requerimento, adicionaram-se 1,6g de L-metionina, precursora da colina, por quilo de dieta, à versão AIN-93G (REEVES et al., 1997).

Veteläinen et al. (2007) observaram que dieta deficiente em colina induz EH menos severa que aquela induzida por dieta deficiente em metionina e colina, caracterizada por inflamação progressiva e fibrinogênese, em ratos. Os autores demonstraram que dietas deficientes em colina e em metionina e colina, simultaneamente, representam dois modelos patogênicos diferentes de EH.

A dieta AIN-93, empregada no presente estudo em suas versões G e M, atende às atuais recomendações nutricionais para roedores de laboratório. No entanto, considerando a presença de EH, é possível que os requerimentos estimados para colina e metionina possam, ainda, não ter sido alcançados, especialmente para os animais em fase de crescimento rápido.

A importância da EH para o aumento do fígado dos animais pode ser evidenciada a partir da análise do peso absoluto do órgão no grupo AIN-93 1m, portadores dos casos mais graves de esteatose. Tal grupo apresentou peso do fígado similar àquele apresentado pelo grupo NUV 4m, de animais mais velhos, com apenas 20% dos animais acometidos por EH. Além disso, observou-se correlação linear positiva entre peso absoluto do órgão e EH ($r=0,60$; $p<0,01$) e estadiamento da EH ($r=0,49$; $p<0,01$), Figura 2 A e E, respectivamente.

Sabe-se que os animais mais jovens apresentam maior proporção entre o peso do fígado e o peso corporal, ou seja, o peso relativo do órgão. No presente estudo, no entanto, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os animais do grupo NUV 1m e os do grupo AIN-93 4m, apesar da diferença de idade. A presença de esteatose poderia justificar tal achado, demonstrando, mais uma vez, a interação entre o peso do órgão e EH.

Quanto ao peso corporal, observou-se uma associação direta com o quadro de EH, em virtude das correlações positivas significativas com o peso absoluto do fígado e com a presença de EH (Figura 2 F e B, respectivamente).

A glicemia, por sua vez, dada a correlação positiva significativa com o GEH e o peso relativo do fígado, apresentou alguma associação com o fenômeno observado, apesar da correlação negativa com o peso corporal e da ausência de correlação com a EH propriamente dita. A comparação entre os quadros grupos

de animais reforça tal consideração, uma vez que os animais mais velhos apresentaram glicemia semelhante à do grupo NUV 1m, sem esteatose, e muito inferior à do grupo AIN-93 1m ($p < 0,05$). Adicionalmente, a alta glicemia apresentada por este grupo de animais, embora estatisticamente semelhante àquela dos animais de mesma idade recebendo a dieta comercial, pode ter um importante significado biológico, desde que o aumentado aporte de glicose para o fígado associa-se ao desenvolvimento de EH, observada em frequência e gravidade significativamente superiores nos grupos alimentados com a dieta purificada.

A trigliceridemia, no entanto, dada a correlação negativa significativa com o peso absoluto do fígado e o peso corporal e a ausência de correlação com o GEH e a EH, sugere que a infiltração gordurosa aqui observada não guardou relação com tal parâmetro bioquímico. Adicionalmente, os demais parâmetros bioquímicos relativos ao perfil lipídico sérico, que guardaram correlação positiva com o peso relativo do fígado e correlação negativa com o peso absoluto do órgão e o peso corporal dos animais, à exceção dos níveis de HDL-c que não guardaram correlação significativa com quaisquer dessas variáveis, não apresentaram associação com o quadro de EH.

Os resultados dos marcadores de função hepática indicam que tais parâmetros bioquímicos não guardaram relação com o quadro de EH, em virtude de sua estreita variação entre os grupos de animais, provavelmente sem significado fisiológico, da ausência de correlação com EH e com GEH, e da correlação positiva com o peso absoluto do fígado e com o peso corporal dos animais, apesar da correlação negativa com o peso relativo do órgão.

Murray et al. (1994) afirmam que a EH é a principal causa de elevação das aminotransferases; no entanto, os níveis séricos de AST e a relação AST/ALT não diferiram entre os grupos. Os níveis de ALT, por sua vez, foram menores no grupo mais jovem alimentado com a dieta AIN-93, com 90% dos animais acometidos por EH, em relação ao grupo mais velho alimentado com a dieta comercial, com 20% de casos.

As aminotransferases estão presentes em altas concentrações no músculo, fígado e cérebro. A elevação da atividade dessas enzimas no sangue indica necrose ou lesão, especialmente nesses tecidos (MURRAY et al, 1994). Segundo Ockner (1993), a elevação dos níveis da ALT é relativamente específica da doença hepatobiliar. Apesar dos níveis de AST poderem aumentar nas doenças de outros órgãos, valores mais de 10 vezes acima do limite superior de variação normal refletem, habitualmente, uma patologia hepática ou biliar (MOTA, 2003).

De acordo com Ravel (1997), na EH os marcadores de lesão hepática são variáveis podendo até mesmo não apresentar nenhuma anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Neste estudo, os níveis de AST e ALT apresentaram correlação negativa com EH (Figura 2 D e C, respectivamente) e com GEH. De maneira similar, os níveis de AST, relação AST/ALT e γ -GT guardaram correlação negativa com o peso do fígado; e, de ALP, γ -GT e relação AST/ALT, com o peso corporal dos animais. Dessa maneira, a EH aqui observada, a exemplo do que ocorreu com os marcadores de função, não induziu anormalidade nos marcadores de lesão hepática, apesar da correlação positiva entre a relação AST/ALT e ALP, com o peso relativo do órgão.

(V) CONCLUSÃO

A dieta AIN-93 peletizada induziu o maior número de casos de EH observados neste estudo; os animais mais jovens apresentaram os casos mais graves. Apesar das modificações na versão anterior (AIN-76A), particularmente em seu conteúdo em sacarose, colina e no aminoácido sulfurado metionina, o problema persiste, sugerindo que a versão atual ainda não representa a formulação mais apropriada para a alimentação de roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento. Os mecanismos que culminaram com o surgimento da EH, no entanto, ainda permanecem obscuros. Apesar de sua presença, a EH não foi suficiente para alterar os marcadores de função e lesão hepáticas. Os dados sugerem, ainda, que o perfil lipídico sérico não guardou relação com a infiltração gordurosa aqui observada. Conclui-se que a composição da dieta e/ou possíveis alterações durante o seu preparo, revestiram-se de particular importância na discussão do quadro observado.

REFERÊNCIAS

1. Anderson JW, Jones AE, Riddell-Mason S. Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. **J Nutr.** 1994; 124(10):2039-40.
2. Arrospide MT. Hígado graso no alcohólico. **Rev Gastroenterol Perú.** 2003; 23(1): 49-57.
3. Ataíde TR, Oliveira SL, Silva FM, Vitorino Filha LGC, Tavares MCN, Sant'Ana AEG. Toxicological analyses of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. **International journal of Food Science and Technology.** doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01757.x (*in press*).
4. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest.** 2004 Jul; 114(2):147-52.
5. Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. In: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. **Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders.** Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005: 168-180.

6. Caligari S, Chiesa G, Johnson SK, Camisassi D, Marchesi M, Parolini C, Rubio LA, Sirtori CR. Lupin (*Lupinus albus*) protein isolate (L-ISO) has adequate nutritional value and reduces large intestinal weight in rats after restricted and ad libitum feeding. **Ann Nutr Metab.** 2006;50(6):528-37.
7. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, LiN R, SamarasinQhe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association the insulin resistance syndrome. **Hepatology.** 2002 Feb; 35(2):373-9.
8. Cotrim HP, Andrade ZA, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas LA. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. **Liver.** 1999 Aug; 19(4):299-304.
9. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** 2002 Oct; 16(5):663-78.
10. Duffy PH, Lewis SM, Mayhugh MA, McCracken A, Thorn BT, Reeves PG, Blakely SA, Casciano DA, Feuers RJ. Effect of the AIN-93M purified diet and dietary restriction on survival in Sprague-Dawley rats: implications for chronic studies. **J Nutr.** 2002 Jan; 132(1):101-7.
11. Failla ML, Babu U, Seidel KE. Use of immunoresponsiveness to demonstrate that the dietary requirement for copper in young rats is greater with dietary fructose than dietary starch. **J Nutr.** 1988 Apr; 118(4):487-96.
12. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev.** 2004 Feb;5(1):27-42.
13. Fields M, Ferretti RJ, Smith JC Jr, Reiser S. Effect of copper deficiency on metabolism and mortality in rats fed sucrose or starch diets. **J Nutr.** 1983 Jul; 113(7):1335-45.
14. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clin.Chem.** 1972; 18:499-502.
15. Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. **Br J Nutr.** 2006; 95(2): 273-81.
16. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. **Obes Res.** 2002 Sep; 10(9):956-63.
17. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation Concentration Method in *Schistosomiasis mansoni*. **Journal Publ. Health & Trop. Med.** 1934; 9:283-298.

18. Kang H, Greenson JK, Omo JT, Chao C, Peterman D, Anderson L, Foess-Wood L, Sherbondy MA, Conjeevaram HS. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. **Am J Gastroenterol**. 2006; 101 (10):2247-53.
19. Kritchevsky S, Tepper SA. Influence of a fiber mixture on serum and liver lipids and on fecal fat excretion in rats. **Nutr Res**. 2005; 25(5):485-9.
20. Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2002 Oct;16(5):679-90.
21. Lien EL, Boyle FG, Wrenn JM, Perry RW, Thompson CA, Borzelleca JF. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. **Food Chem Toxicol**. 2001 Apr; 39(4):385-92.
22. Loza RAC, Peñaloza RLC, Bustamante PAH, Thieleman L. La enfermedad de hígado graso no alcohólica y su asociación con obesidad y estrés oxidativo hepático. **Med UNAB**. 2003; 6(16):15-20.
23. Leclercq IA, Morais AS, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **J Hepatol**. 2007 Jul;47(1):142-56.
24. Lucena ALM. Avaliação toxicológica subcrônica de dieta cetogênica à base de trienantina em ratos jovens. [Dissertação]. Maceió (AL): **Universidade Federal de Alagoas**; 2007.
25. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate A, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **Am J Med**. 1999 Nov; 107(5):450-5.
26. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. 1999 Jun;116(6):1413-9.
27. Medinsky MA, Popp JA, Hamm TE, Dent JG. Development of hepatic lesions in male Fischer-344 rats fed AIN-76A purified diet. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1982 Jan; 62(1):111-20.
28. Mezdri TJ, Tomás VA, Amaral VLL. **Animais de Laboratório- Cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004.
29. Motta VT. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial; 2003.
30. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. **Harper: bioquímica**. 7th.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo; 1994.
31. National Research Council. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**. 4rd ed. Washington: National Academy Press; 1995.

32. Newberne PM, Fox JG. Nutritional adequacy and quality control of rodent diets. **Lab Anim Sci**. 1980 Apr; 30(2 Pt 2):352-65.
33. Nuvital, 2006. Disponível em: URL:
<http://www.nuvital.com.br/index.php?opt=produto&m=s&id=44>.
34. Ockner RK Doenças do Fígado, da Vesícula Biliar e dos Ductos Biliares. In WYNGAARDEN, J.B. editor. **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1993.
35. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**. 2007 Jul 14; 13(26):3540-53.
36. Rao GN, Morris RW, Seely JC. Beneficial effects of NTP-2000 diet on growth, survival, and kidney and heart diseases of Fischer 344 rats in chronic studies. **Toxicol Sci**. 2001 Oct; 63(2):245-55.
37. Ravel R. Laboratório Clínico. **Aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
38. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76 A Diet. **The Journal of Nutrition**. 1997; 127(5):838-841.
39. Rubio LA, Grant G, Daguid T, Brown D, Pusztai A. Organs relative weight and plasma amino acid concentrations in rats fed diets based on whole legume (fafa bean, lupin chickpea, defatted soybean) seed meals or their fractions. **J Sci Food Agric**. 1999; 79:187-94.
40. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **J Biol Chem**. 2004; 279, (31): 32345-32353.
41. Silva et al. Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia ABE&M** (*in press*) MS#231/07.
42. Tachibana N, Matsumoto I, Fukui K, Arai S, Kato H, Abe K, Takamatsu K. Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. **J Agric Food Chem**. 2005; 18;53(10):4253-7.
43. Veteläinen R, Vliet AV, Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2007; 22(9):1526-1533.
44. Zeisel SH. Choline: An essential nutrient for humans. **Nutrition**. 2000; 16:7-8. Wang ZQ, Zuberi AR, Zhang XH, Macgowan J, Oin J, Ye X, Son L, Wu Q, Lian K, Cefalu WT. Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. **Metabolism**. 2007; 56(12):1635-42.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permite concluir que dentre os fatores envolvidos no surgimento da EH destaca-se a resistência à insulina, provavelmente o elo entre a obesidade, o *diabetes mellitus* tipo 2 e a síndrome metabólica. Nesse contexto, alterações do metabolismo do tecido adiposo parecem desempenhar papel central nas disfunções hemodinâmicas e metabólicas observadas no tecido hepático, culminando com esteatose.

O papel do fígado como amortecedor sistêmico, aumentando seu percentual de lipídios frente ao aumento da oferta sérica, leva à diminuição da sensibilidade à insulina neste órgão, com aumento da produção de glicose, redução do *clearance* de insulina, com posterior hiperinsulinemia, e esteatose hepática.

No estudo experimental, a dieta AIN-93 peletizada induziu EH; os animais mais jovens apresentaram os casos mais graves. Apesar das modificações na versão anterior (AIN-76A), apontada como indutora do quadro, o problema persiste, sugerindo que a versão atual ainda não representa a formulação mais apropriada para a alimentação de roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento. Os mecanismos que culminaram com o surgimento da EH, no entanto, ainda permanecem obscuros.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**. 2006 Feb;87(1):1-16.
2. Ataíde TR, Oliveira SL, Silva FM, Vitorino Filha LGC, Tavares MCN, Sant'Ana AEG. Toxicological analyses of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. **International journal of Food Science and Technology**. doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01757.x (in press).
3. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**. 2004 Jul;114(2):147-52.
4. Caldwell SH, Hylton AI. The clinical outcome of NAFLD including cryptogenic cirrhosis. In: Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2005: 168-180.
5. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Li N R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association the insulin resistance syndrome. **Hepatology**. 2002 Feb;35(2):373-9.
6. Den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004 Apr;24(4):644-9.
7. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev**. 2004 Feb; 5(1):27-42.
8. Lucena ALM. Avaliação toxicológica subcrônica de dieta cetogênica à base de trienantina em ratos jovens. [Dissertação]. Maceió (AL): Universidade Federal de Alagoas; 2007.
9. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate A, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **Am J Med**. 1999 Nov;107(5):450-5.
10. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. 1999 Jun;116(6):1413-9.
11. Medinsky MA, Popp JA, Hamm TE, Dent JG. Development of hepatic lesions in male Fischer-344 rats fed AIN-76A purified diet. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1982 Jan; 62(1):111-20.
12. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76 A Diet. **The Journal of Nutrition**. 1997; 127(5):838-841.