

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

***ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS: EFEITOS DE DIETA
COM DIFERENTES NÍVEIS DE SUBSTITUIÇÃO LIPÍDICA
POR DIEPTANOÍNA E TRIEPTANOÍNA***

MARIA ADRIANA FIRMINO DA SILVA

MACEIÓ-2007

MARIA ADRIANA FIRMINO DA SILVA

***ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS: EFEITOS DE DIETA
COM DIFERENTES NÍVEIS DE SUBSTITUIÇÃO LIPÍDICA
POR DIEPTANOÍNA E TRIEPTANOÍNA***

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à 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 de Lima Oliveira**
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ-2007

Dedicado a Deus pelo dom da vida, aos meus pais Irene e Cícero por tudo que me ensinam; à minha irmãzinha futura pediatra Amanda, ao meu irmão Robson e ao meu esposo Everton Barreto.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.^a Dra. Terezinha Ataíde, pelo apoio e incentivo, amizade, orientação e principalmente pela motivação pela pesquisa científica.

Aos meus “eternos mestres” Prof.^a Lucí Tojal e Seara, quem primeiro me deu oportunidade de iniciar a pesquisa científica; ao Prof. José de Souza Leão, por todos os ensinamentos e motivação profissional; à Prof.^a Suzana de Lima Oliveira, também pela co-orientação, à Prof.^a Maria de Lourdes Assis, pessoas que fizeram à diferença na minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Anna pelo apoio com o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia/UFAL

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

À Fernanda Galdino e Mércia Cruz pelo apoio no desenvolvimento das análises e companheirismo e ajuda na coleta de dados.

À Prof.^a Lúcia Rebouças do Instituto de Química e Biotecnologia/UFAL, e aos estagiários do seu Laboratório, Adilson e Fred por sempre estarem prontos para ajudar.

Às minhas companheiras de trabalho, em especial Taciana Guedes, amiga que sempre esteve ao meu lado, Monique David e Fabiana Moura pelo apoio, amizade e carinho.

Aos meus mestrandoamigos, em especial ao Francisco Freire (in memoriam) que me fez refletir que às vezes não percebemos ou demonstramos o quanto especial são nossos amigos.

A todos que sempre serviram como motivação e contribuíram para a realização deste trabalho

*“Entrega teu caminho ao Senhor,
Confia n’Ele, e o mais,
Ele fará”
Sl 37-5*

RESUMO

A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo de triacilgliceróis no citoplasma dos hepatócitos a um nível que atinge 5 a 40% do peso do fígado. Sua prevalência tem aumentado em todo o mundo devido a forte relação com o *diabetes mellitus* tipo 2 e a obesidade, doenças que se constituem epidemias globais. 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 fibrogênese, cirrose e ao carcinoma hepatocelular. Sua etiologia, apesar de não estar totalmente elucidada, mostra forte correlação com a resistência à insulina, sendo, atualmente, considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica. Entretanto, pode ser desencadeada por outros fatores, como nutrição parenteral total prolongada, cirurgia bariátrica, desnutrição calórico-protéica e o uso de drogas. Embora a prevalência verdadeira seja desconhecida, atinge adultos e crianças e está emergindo como a condição crônica do fígado mais comum no mundo ocidental. Apesar de ainda não existir tratamento farmacológico eficaz, todos os pacientes são encorajados a reduzir a ingestão de gorduras e praticar exercícios físicos regulares, com o objetivo de aumentar o gasto energético diário. Estratégias de intervenção nutricional e controle dos fatores de risco metabólico associados devem ser avaliadas. Visando contribuir com a discussão do problema, esta dissertação apresenta dois artigos: uma revisão da literatura com as principais estratégias da terapêutica dietética no tratamento da esteatose, tratando de oferta energética e aporte de macro e micronutrientes que exercem efeitos na prevenção, tratamento e/ou retardo da progressão da doença; o

segundo artigo refere-se a um estudo experimental com ratos *Wistar* recém desmamados, que receberam dieta com substituição do óleo de soja por um óleo experimental rico em trieptanoína, um triacilglicerol do ácido heptanóico (7:0), que vem sendo utilizado em desordens do metabolismo oxidativo mitocondrial. Os animais que receberam dietas AIN-93 com 0, 30 e 50% de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental desenvolveram esteatose hepática. A análise histológica revelou metade do número de casos graves de esteatose hepática nos animais com 50% de substituição em relação àqueles submetidos a 0% de substituição. Outras variáveis evidenciaram potencial efeito protetor do óleo experimental contra a esteatose, como peso absoluto e relativo do fígado. Tal efeito, associado às evidências clínicas de sucesso do uso da trieptanoína em algumas desordens mitocondriais, desperta o interesse em investigações futuras de sua aplicação terapêutica em outras desordens.

Palavras-chave: Esteatose hepática; dieptanoína; trieptanoína; resistência à insulina, TCM.

ABSTRACT

Hepatic steatosis is characterised by accumulation of triacylglycerols in the cytoplasm of hepatocytes at a level that reaches 5 to 40% of the weight of the liver. Its prevalence has increased worldwide, having a strong relationship with *diabetes mellitus type 2* and obesity, diseases that constitute a global epidemic. Despite having been considered for a considerable time as a benign entity, it is known that a synergic combination with other factors, such as oxidative stress, can trigger a cascade of inflammatory reactions, leading to fibrogenesis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Its etiology, despite not being totally elucidated, shows a strong correlation with insulin resistance, and is actually considered a hepatic manifestation of metabolic syndrome. However, it can be triggered by other factors; such as prolonged total parenteral nutrition, bariatric surgery, protein-calory malnutrition and the use of drugs. The actual prevalence is unknown but it affects adults and children, and is emerging as the most common chronic condition of the liver in the western world. Though an effective pharmacological treatment does not exist, all patients are encouraged to reduce their ingestion of fat and to practise regular physical exercise, with the objective of increasing their daily energy expenditure. Strategies of nutritional intervention and control of associated metabolic risk factors need to be evaluated. Aiming at contributing to the discussion of the problem, this dissertation presents two articles: a literature review of the main strategies of dietetic therapy in the treatment of steatosis, dealing with energy intake and the intake of macro- and micronutrients that exert effects on the prevention, treatment and/or retard the progression of the disease; the second article refers to an experimental study of weaned Wistar rats that received a diet with substitution of soy oil with an experimental oil rich in

triheptanoin, a triacylglycerol of heptanoic acid (7:0), that was being used in disorders of mitochondrial oxidative metabolism. The animals that received AIN-93 diets with 0, 30 and 50% of substitution of soy oil with experimental oil developed hepatic steatosis. The histological analysis revealed half the number of severe cases of hepatic steatosis in the animals with 50% substitution in relation to those with 0% substitution. Other variables demonstrated a potential protector effect of the experimental oil against hepatic steatosis as absolute and relative liver weight. Such an effect, associated with the clinical evidence of the success of triheptanoin with several mitochondrial disorders, awakes interest in the future of its application for other disorders.

Key words: hepatic steatosis, diheptanoin, triheptanoin, insulin resistance, MCT.

LISTA DE FIGURAS

Página

1º artigo: artigo de revisão

Esteatose hepática: avanços no tratamento nutricional

- Figura 1 Mecanismo básico para o acúmulo hepático de triacilgliceróis na resistência à insulina..... 26

2º artigo: artigo de resultados

Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos

- Figura 1 Cortes histológicos do tecido hepático 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**), observada nos animais dos grupos Controle, TAGC70, TAGC730, e TAGC750..... 54
- Figura 2 Análises de regressão linear simples e coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis graus de esteatose hepática (GEH) (**A**); peso final (peso) (**B**); peso absoluto do fígado (PAF) (**C**); lipídios hepáticos (LH) (**D**); peso relativo do fígado (PRF) (**E**); e glicemia (**F**)..... 59

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Composição das dietas TAGC ₇₀ , TAGC ₇₃₀ e TAGC ₇₅₀ baseadas nas dietas AIN-93 G (G) para o crescimento e AIN-93 M (M) para a idade adulta dos animais.....	52
Tabela 2	Graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), percentual de lipídios hepáticos (%LH), peso absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos Controle, TAGC ₇₀ , TAGC ₇₃₀ eTAGC ₇₅₀	56
Tabela 3	Análises das variáveis bioquímicas dos animais dos grupos Controle, TAGC ₇₀ , TAGC ₇₃₀ eTAGC ₇₅₀	57
Tabela 4	Médias estimadas para os grupos TAGC ₇₀ , TAGC ₇₃₀ , TAGC ₇₅₀ pela equação de regressão linear univariada para grau de esteatose hepática (GEH), peso corporal, peso absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado, percentual de lipídios hepáticos (LH) e glicemia.....	60

Lista de abreviaturas

AG - Ácidos graxos

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

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

AGL - Ácidos graxos livres

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CTP – Carnitina palmitoil transferase

DFGNA – Doença do fígado gorduroso não alcoólica

EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica

EROS – Espécies reativas de oxigênio

GGT – Gama glutamiltransferase

GHE – Graus de esteatose hepática

HDL-c – *High density lipoprotein Cholesterol*

HOMA – Homeostasis model assement

IG – Índice glicêmico

IL6 – Interleucina 6

IL8 - Interleucina 8

IMC – Índice de massa corporal

LDL-c – *Low density lipoprotein Cholesterol*

LH – Lipídios hepáticos

MDA - Malondialdeído

PAF – Peso absoluto do fígado

PCF – Peso corporal final

PRF – Peso absoluto do fígado

SM – Síndrome metabólica

TAG - Triacilgliceróis

TAGC₇₀ – Animais que receberam dieta com 0% de óleo experimental

TAGC₇₃₀ - Animais que receberam dieta com 30% de óleo experimental

TAGC₇₅₀ - Animais que receberam dieta com 50% de óleo experimental

TCL – Triacilgliceróis de cadeia longa

TCM - Triacilgliceróis de cadeia média

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL – *Very low density lipoprotein Cholesterol*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	19
1º artigo: artigo de revisão	
Esteatose hepática: avanços no tratamento nutricional.....	20
2º artigo: artigo de resultados	
Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos.....	43
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

A esteatose hepática (EH), entidade clínica descrita desde o século XIX, é uma hepatopatia que decorre do acúmulo de gordura histologicamente visível nos hepatócitos, a um nível que atinge 5 a 40% do peso do fígado¹. Relacionava-se fundamentalmente à ingestão de álcool, com evolução para cirrose². Entretanto, com o advento da transição nutricional, marcada pela epidemia global de obesidade, tem sido observada em pacientes que não fazem uso abusivo de álcool. Desde então, apresenta-se associada a elementos da síndrome metabólica (SM), como o *diabetes mellitus* tipo 2, a obesidade e as dislipidemias³.

No fígado, importante órgão do metabolismo lipídico, os ácidos graxos livres (AGL) são esterificados em triacilgliceróis (TAG) e exportados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ou são oxidados na mitocôndria, peroxissomos e microsossomos. O nível aumentado de lipídios no hepatócito de pacientes com EH resulta, normalmente, de um desequilíbrio entre os sistemas enzimáticos que promovem a captação e a síntese e aqueles que promovem oxidação e exportação dos AGL⁴.

Neste contexto, a resistência à insulina, de incidência crescente nos últimos tempos, provoca acúmulo lipídico no hepatócito por aumento da lipólise no tecido adiposo, com conseqüente aumento do influxo de AGL no fígado. Isto leva a alterações metabólicas hepáticas, decorrentes do aumento da síntese de TAG, da diminuição de sua exportação, através da redução dos níveis de VLDL, e da redução na β -oxidação, resultando em EH. Muitos trabalhos têm apontado a hiperinsulinemia e a resistência à insulina como mecanismos etiopatogênicos comuns entre a EH e a SM⁵⁻⁷.

Acreditava-se que a EH era uma forma benigna de doença hepática. No entanto, sabe-se atualmente que pode evoluir para formas mais graves de injúria hepática, como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), em 30%, e dentre estes, 20% evoluem para cirrose^{8,9}. Apesar de a gordura hepática ser bem tolerada, frequentemente provocando sinais e sintomas leves, promove uma maior vulnerabilidade a injúrias provocadas por certas drogas, como álcool, pelo vírus C, por produtos bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), e pela isquemia-reperfusão¹⁰.

A exposição a esses fatores pode levar à inflamação e à morte dos hepatócitos, progredindo para fibrose e cirrose. Dessa forma, a evolução da EH para formas mais graves de injúria hepática, que, no conjunto, constituem a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA), pode ser explicada pela hipótese dos dois *hits*. O mecanismo que causa a EH é considerado o primeiro *hit*, ou seja, a agressão inicial. Assim, a resistência à insulina, que promove hiperinsulinemia (primeiro *hit*), favorecendo a lipólise no tecido adiposo, aumenta excessivamente o aporte de AGL para o fígado, podendo resultar em EH. O primeiro *hit* deixa o hepatócito mais vulnerável ao segundo *hit*, agressões promovidas por vírus, álcool, LPS, dentre outros, os quais exarcebam o estresse oxidativo hepático, levando à EHNA, à cirrose e ao hepatocarcinoma¹¹.

Embora ainda não exista tratamento farmacológico eficaz para a EH, todos os pacientes são encorajados a reduzir a ingestão de gorduras e praticar exercícios físicos regulares, com o objetivo de aumentar o gasto energético diário¹²⁻¹⁴. Estratégias de intervenção nutricional e controle dos fatores de risco metabólicos associados devem ser avaliadas.

Desta forma, esta dissertação teve como finalidade identificar e discutir os atuais aspectos nutricionais que norteiam o tratamento da esteatose hepática, através de revisão da literatura. E, ainda, avaliar as repercussões hepáticas e alterações metabólicas associadas do consumo crônico de um óleo experimental rico em trieptanoína, em ratos com EH, num trabalho iniciado por Ataíde et al.¹⁵, em 2004.

A trieptanoína, um TAG de cadeia média (TCM) do ácido enântico, que apresenta uma característica incomum à maioria dos TCM, ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono, tem propriedade anaplerótica. Ou seja, fornece intermediários do ciclo de Krebs; na última volta da β -oxidação, gera, além de acetil-CoA, propionil-CoA. Por essa propriedade, tem sido utilizada em pacientes com desordens do metabolismo oxidativo mitocondrial^{16,17}.

A dissertação é composta por dois artigos, o primeiro de revisão da literatura sobre os avanços nutricionais no tratamento da EH e, o segundo, oriundo de um estudo experimental com ratos *Wistar*, que desenvolveram esteatose hepática submetidos a dietas com diferentes graus de substituição lipídica por um óleo experimental, rico em trieptanoína. Nas condições experimentais estabelecidas, o óleo experimental pareceu exercer efeito hepatoprotetor. A etiologia da EH no referido estudo é tema de discussão do segundo artigo.

1º artigo: artigo de revisão

SILVA, MAF; ATAIDE, TR; OLIVEIRA, SL. Esteatose Hepática: avanços no tratamento nutricional.

RESUMO

A esteatose hepática é considerada atualmente a manifestação hepática da síndrome metabólica e, apesar de ser uma condição benigna, pode evoluir para esteato-hepatite, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma. A terapêutica atual é baseada em mudanças de estilo de vida, pois não há tratamento farmacológico seguro e eficaz. Esta revisão da literatura inclui estudos que avaliam a eficácia de intervenções dietéticas usadas no tratamento e na prevenção da progressão da doença. Fatores dietéticos, como o controle da oferta energética, a redução do aporte e seleção adequada de carboidratos e lipídios, têm se mostrado efetivos em intervenções clínicas e/ou em estudos experimentais. As modificações dietéticas e de estilo de vida são consideradas seguras, além de contribuírem com benefícios adicionais à saúde, devendo ser a primeira linha de intervenção em pacientes com esteatose e sobrepeso ou obesidade. Outras intervenções dietéticas, como o uso de antioxidantes, apesar de alguns resultados promissores, ainda necessitam de estudos adicionais que garantam a eficácia e a segurança do seu uso, neste contexto. Portanto, recomenda-se aporte dietético normal destes compostos.

Termos de indexação: fígado gorduroso, resistência à insulina, dietoterapia.

ABSTRACT

Hepatic steatosis is actually considered to be a hepatic manifestation of metabolic syndrome and despite being a benign condition, it can develop into steatohepatitis, fibrosis, cyrrhosis and hepatocarcinoma. The current therapy is based on lifestyle changes, because there is no safe and effective pharmacotherapy. This literature review includes studies that evaluated the efficacy of dietary interventions used in the treatment and prevention of the disease. Dietary factors, such as the control of energy intake and the supply and adequate selection of carbohydrates and lipids, have been shown to be effective in clinical intervention and/or in experimental studies. Dietary and lifestyle modifications are considered safe, furthermore they contribute additional health benefits, and are the first line of intervention in patients with steatosis and who are overweight or obese. Other dietary interventions, with the use of antioxidants, despite having some promising results, still need further studies to guarantee the efficacy and safety of their use in this context. Therefore the normal dietary intake of these compounds is recommended.

Term index: fatty liver, insulin resistance, diet therapy.

INTRODUÇÃO

A esteatose hepática (EH) desperta grande interesse no atual contexto de transição nutricional por sua forte ligação com a obesidade, as dislipidemias e o *diabetes mellitus*, sendo considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica, que tem a resistência à insulina como principal componente¹⁻⁷.

É uma hepatopatia comum e decorre do acúmulo de gordura histologicamente visível nos hepatócitos, constituída por triacilgliceróis (TAG), sintetizados a partir de ácidos graxos (AG) do tecido adiposo e dos quilomícrons provenientes do intestino⁸, a um nível que atinge 5 a 40% do peso do fígado⁹.

A EH pode ter como causa os transtornos da oxidação hepática de gorduras, a síntese aumentada de gorduras pelo fígado e o aporte aumentado de ácidos graxos, comuns na obesidade e no *diabetes mellitus* tipo 2, ou a redução do transporte de gordura hepática, nos estados de deficiência de proteínas, fosfatos e colina, indispensáveis para a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL)⁹. Outros fatores como drogas, defeitos genéticos no metabolismo energético e nutrição parenteral total¹⁰ podem concorrer para o surgimento do problema.

Embora a prevalência verdadeira seja desconhecida^{11,12}, a EH atinge adultos e crianças¹⁰ e está emergindo como a condição crônica do fígado mais comum no mundo ocidental^{13,14}. Estimativas sugerem que 20-30% dos adultos em países ocidentais podem ter EH¹⁵ e até 75% dos pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade¹². Destes, aproximadamente 10% apresentam sinais típicos de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA)¹⁶, que é caracterizada pela presença adicional de infiltrado inflamatório e fibrose¹⁵. Apesar de ser potencialmente reversível⁹, a EH é uma doença crônica que pode progredir para EHNA, que, no

conjunto, constituem a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA), e, posteriormente, para cirrose e hepatocarcinoma^{6,10,17}.

A severidade da esteatose é correlacionada positivamente com o índice de massa corporal (IMC), com as concentrações de glicose, de insulina, de TAG e de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT) do plasma, sendo a causa mais freqüente da elevação de aminotransferases^{9-11,16}.

Dado o aumento da prevalência mundial de resistência à insulina e da síndrome metabólica (SM), é crescente a incidência da esteatose; entretanto, sua patogênese e significado clínico permanecem pouco definidos e não há nenhum tratamento ideal estabelecido¹⁸.

Não existe atualmente uma medicação efetiva; estudos revelam que dieta e exercício físico, que levam à redução ponderal, refletem em melhora nos níveis séricos de aminotransferases, albumina, colesterol total e glicose, com redução significativa da EH^{1,15,19}. Além disso, atualmente, tem se demonstrado o benefício de algumas substâncias antioxidantes na prevenção da progressão de EH à EHNA^{8,20}. Neste contexto, esta revisão teve como objetivo identificar e avaliar o impacto de estratégias dietéticas no tratamento da EH e na prevenção de sua progressão à EHNA.

FISIOPATOLOGIA DA ESTEATOSE HEPÁTICA

A patogenia da EH permanece especulativa^{3,9}; no entanto, a retenção de TAG no interior do hepatócito é o pré-requisito para o seu desenvolvimento. Essencialmente, existe uma quebra do equilíbrio entre os fatores lipotróficos e lipogênicos, com importante participação da resistência à insulina neste processo, considerada um fator quase universal²¹. A compreensão da patogênese da EH, e

particularmente dos fatores responsáveis pela lesão progressiva do fígado, permitirão a melhor escolha da conduta terapêutica²².

Mecanismos subjacentes ao acúmulo de gordura no fígado podem incluir gordura dietética adicional, entrada aumentada de ácidos graxos livres (AGL) no fígado, síntese hepática aumentada de AG a partir de carboidratos, oxidação inadequada de AG, lipogênese aumentada e/ou remoção deficiente de TAG do fígado, na forma de VLDL^{9,21}. Atualmente a resistência à insulina tem sido considerada o gatilho inicial, principalmente em obesos e portadores de *diabetes mellitus* tipo 2.

A resistência à insulina, que conduz a um aumento do influxo hepático de AGL, está associada com o acúmulo de AG nos hepatócitos, decorrente do aumento da lipólise. Além disso, a hiperinsulinemia, que aumenta a glicólise hepática, elevando os níveis de acetil-CoA, que podem ser convertidos em AG^{1,21}, associada à produção reduzida de apoB100, necessária à exportação de TAG, favorece o acúmulo de triacilgliceróis no hepatócito^{14,16}.

A liberação aumentada de AGL dos adipócitos decorre de intensa ativação da lipase hormônio sensível, que mobiliza os estoques de TAG dos adipócitos, com conseqüente elevação dos níveis de AGL no plasma^{10,23}. Estes podem seguir duas vias: 1- são captados pelo hepatócito, onde são esterificados com o glicerol, originando, novamente, TAG; ou 2 - são oxidados para a formação de corpos cetônicos⁶. Uma das principais características da resistência à insulina são as elevadas concentrações de β -hidroxibutirato¹. O excesso de oferta de AGL no fígado excede a capacidade do hepatócito de processá-lo e exportá-lo como VLDL, devido à intensa mobilização do tecido adiposo. Como conseqüência, o

excesso de esterificação e acúmulo de TAG no citoplasma levam à EH²⁴ (Figura 1).

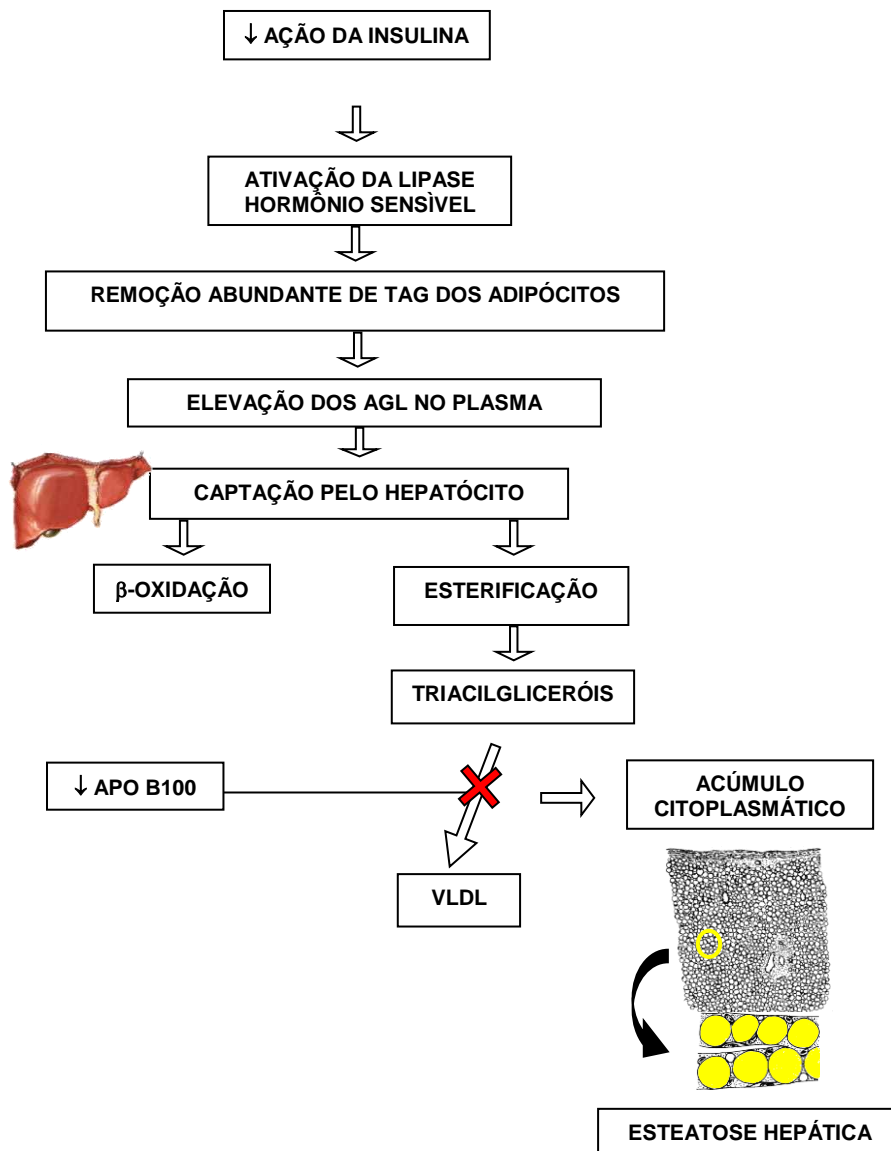


Figura 1 - Mecanismo básico para o acúmulo hepático de triacilgliceróis na resistência à insulina. TAG – triacilgliceróis, AGL – ácidos graxos livres, VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade.

A EH é um processo reversível, desde que sejam removidos os fatores causais. Entretanto, sua persistência prolongada, associada a outras agressões, como estresse oxidativo, liberação de citocinas⁸ e obesidade, pode levar à destruição progressiva dos hepatócitos, com fibrose difusa do parênquima e

perda da arquitetura funcional do fígado (cirrose hepática)²⁴. Várias evidências sugerem a participação das espécies reativas de oxigênio (EROS), considerada o gatilho na progressão da doença^{8,11}. Amostras de fígado de pacientes com esteatose encontram-se em uma condição pró-oxidante significativamente maior que em indivíduos normais^{8,23}. As EROS são importantes agentes pró-inflamatórios que parecem ativar as células de Ito, favorecendo a fibrogênese^{23, 25}. Outros fatores também podem estar envolvidos, como anormalidades mitocondriais e distúrbios hormonais que envolvem a leptina e a adiponectina^{5,22}.

ASPECTOS NUTRICIONAIS DO TRATAMENTO

A dieta ideal para tratar EH ainda não foi estabelecida^{8,22}, uma estratégia do tratamento atual visa a eliminação dos fatores de risco, compreendendo dieta supervisionada, exercício físico e gerência de circunstâncias metabólicas associadas, que tem conduzido à melhora nas aminotransferases^{1,26}. Dentre as terapias dietéticas, destacam-se aquelas que incluem restrição calórica, redução do aporte e seleção do tipo de lipídios e carboidratos, além do estímulo ao consumo de fatores lipotróficos, como a fosfatidilcolina, e de antioxidantes, como a vitamina E^{16,17}. Entretanto, não existem estudos conclusivos que determinem que estas ações modifiquem a história natural da doença¹.

A perda de peso, com uma dieta saudável, e a prática regular de exercício de moderada intensidade são o tratamento padrão¹⁷; no entanto, outras estratégias de tratamento da SM e da resistência à insulina, devem ser avaliadas²⁷. O tratamento também deve ser oferecido àqueles pacientes considerados de maior risco, ou seja, obesos e diabéticos, visando impedir a instalação e a progressão de lesão hepática²².

Restrição calórica

A maioria dos pacientes com EH tem estilo de vida relativamente sedentário e apresentam sobrepeso ou obesidade²⁸. Na ausência de outras causas, a obesidade está muito associada com a doença hepática²⁹. Como não existe tratamento medicamentoso efetivo até o momento, a dieta hipocalórica, que leva à perda ponderal nos obesos, reduz os níveis de aminotransferases e o acúmulo de gordura hepática⁸. A melhora já é observada com uma redução de apenas 5% do peso corporal²⁸. Em um estudo, envolvendo 351 autopsias, observou-se que 70% dos obesos tinham esteatose hepática, de gravidade proporcional ao grau de obesidade¹⁶. Um estudo piloto mostrou melhora nas aminotransferases com uma perda de peso média de 10 kg, após seis meses de tratamento³⁰. Em um estudo retrospectivo de pacientes obesos sem doença hepática preliminar, perdas de peso superiores a 10% corrigiram testes hepáticos anormais e diminuíram a hepatoesplenomegalia¹⁶.

No estudo de Vajro et al.³¹, em crianças, a dieta e o exercício, que conduziram à perda de peso de aproximadamente 500g/semana, promoveu redução nas aminotransferases e na EH. Similarmente, foi encontrada normalização de testes hepáticos e redução ou reversão da EH, em 33 crianças obesas, com idade média de $9,5 \pm 2,9$ anos, submetidas à perda de peso com dieta (1200 a 1400 Kcal/dia) e exercício físico (pelo menos seis horas/semana)³².

Uma vez que a obesidade é a condição mais associada com a EH e a perda de peso é a intervenção tradicional geralmente sugerida, os pacientes são incentivados a perder peso com exercícios e limitação da gordura dietética. O exercício diminui a obesidade visceral, impedindo a perda da massa muscular¹⁶. Além disso, aumenta a sensibilidade à insulina no músculo, mesmo na ausência

de perda de peso. A melhora na bioquímica hepática e nos achados ultrassonográficos são associados consistentemente com perda de peso moderada.

Apesar dos dados demonstrarem que EH e EHNA melhoram significativamente com perda ponderal, isto deve ser feito de maneira controlada; a rápida perda de peso (superior a 1,6kg/semana) pode conduzir à exacerbação da doença hepática, como é observado em pacientes que se submetem à cirurgia bariátrica, um tratamento cirúrgico para pacientes com obesidade mórbida^{16,22}.

A rápida perda de peso induzida por dieta de muito baixa energia (388 kcal/dia) está associada com níveis aumentados de bilirrubina sérica e inflamação na região portal³³. Desta forma, a limitação de energia deve ser bem avaliada com dietas supervisionadas por nutricionista. Aproximadamente 25-30 kcal/kg/dia para indivíduos adultos parecem razoáveis para uma perda de cerca de 10% do peso corporal, em seis meses²². Outro estudo afirma que a restrição dietética de 500Kcal resulta em perdas de 4% do peso corporal, com redução significativa dos depósitos adiposos subcutâneo abdominal, intra-abdominal e intra-miocelular. As mudanças na composição corporal foram acompanhadas por melhora nos níveis séricos de AST e ALT³⁴, demonstrando que, mesmo reduções modestas de peso, podem refletir em mudanças positivas na composição corporal e na integridade celular.

Em estudo realizado por Colicchio et al.²⁹, com pacientes obesos graves, as aminotransferases séricas, particularmente a ALT, aumentaram de acordo com o IMC e com o grau de EH. O índice de avaliação da homeostase (HOMA - *homeostasis model assessment*), a ferritina e os níveis de fibrinogênio aumentaram com o IMC, particularmente na esteatose severa. Estes dados sugerem que, em

pacientes obesos graves, não diabéticos, a EH está estreitamente relacionada à resistência à insulina e, quando severa, à elevação da ferritina sérica.

No trabalho de Petersen et al.³⁵, com pacientes portadores de *diabetes mellitus* tipo 2, a reversão da EH e da resistência hepática à insulina e a normalização dos níveis de produção de glicose, pela perda moderada de peso (8kg ou 8% do peso corporal), foram atribuídas inteiramente à redução na gliconeogênese. Porém, as concentrações de ácidos graxos no plasma, de TAG, de resistina, interleucina 6 (IL-6), adiponectina e de cortisol, não foram alteradas pela perda de peso, sugerindo que a mesma, *per si*, não exerceu papel decisivo na reversão da resistência hepática à insulina, nestes indivíduos. No entanto, as concentrações plasmáticas de glucagon diminuíram 25% após a perda de peso, sugerindo um papel importante da hiperglucagonemia crônica em promover a gliconeogênese, aumentando a resistência hepática à insulina, em pacientes portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 descompensados.

Apesar destas evidências clínicas, Clark¹⁷ questionou que as mesmas, além de poucas, apresentam limitações metodológicas, como ausência de controle de algumas variáveis decisivas, para suportar a afirmação de que a redução ponderal é eficaz na reversão da EH. O autor, em sua meta-análise sobre o tema, observou que apenas três grupos publicaram dados de estudos experimentais que envolviam um grupo controle, com melhora nas enzimas e/ou na patologia hepática.

Desta forma, são necessários mais estudos que comprovem, de maneira decisiva, a associação entre perda ponderal, em decorrência de restrição calórica, e DFGNA, em particular a EH.

Aporte dietético de lipídios

Apesar de serem muito relacionadas, a resistência à insulina nos seres humanos nem sempre é acompanhada pela obesidade. Quadros severos de resistência à insulina podem ser encontrados em pacientes com déficit de gordura subcutânea, como aqueles portadores do vírus da imunodeficiência humana – HIV, sob terapia anti-retroviral, com lipodistrofia associada³⁶. Nestes casos e em pacientes que não apresentam excesso de peso, outras estratégias terapêuticas necessitam ser estabelecidas, visto que a redução ponderal não está indicada.

Além disso, a manipulação dos diversos nutrientes da dieta deve ser avaliada para que se estabeleça um conjunto de ações eficazes para o equacionamento do problema. Neste sentido, Miranda et al.²⁰ avaliaram o impacto de uma dieta normolipídica (25% do aporte energético) e normocalórica (30-40 kcal/kg), em pacientes com diferentes graus de EH e faixas de IMC, durante um ano. Seus resultados revelaram melhora na função hepática, redução nas concentrações de colesterol e TAG séricos e na gravidade de esteatose, na maioria dos pacientes. Alguns deles, inclusive, apresentaram reversão do quadro de EH, sendo maior a probabilidade de cura quanto menor a infiltração gordurosa.

No estudo de Werner et al.³⁷, a deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) diminuiu as concentrações plasmáticas e aumentou os níveis hepáticos de TAG, em ratos. Análises *in vivo* e *in vitro* indicaram que a deficiência não afetou a secreção hepática quantitativa de TAG, mas alterou o tamanho e a composição das VLDL. Especulou-se que as partículas grandes de VLDL, talvez em combinação com a expressão aumentada de apolipoproteína C-II (Apo-CII), resultaram em hipotrigliceridemia.

Outro trabalho com ratos revelou que três dias de elevação da gordura dietética triplicam os 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 EH¹². Corroborando com este estudo, Gauthier³⁸, 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 também que o desenvolvimento da EH está mais ligado à ingestão da gordura dietética do que ao ganho de peso corporal propriamente.

Aporte dietético de carboidratos

A síndrome metabólica nos pacientes com EH está associada com uma dieta que contém mais carboidratos. O papel de uma dieta restrita em carboidratos na diminuição do risco para a síndrome metabólica e a severidade histológica do dano hepático deve ser avaliado nestes pacientes, visto que o excesso dietético de carboidratos serve como precursor para uma maior produção de TAG².

As dietas reduzidas em gordura podem ser de difícil adesão e os estudos recentes mostraram o potencial de dietas restritas em carboidratos para a perda de peso e melhora da resistência à insulina³⁹.

Uma dieta elevada em carboidratos resulta em um aumento na glicemia, na insulina e nos níveis de TAG, que são fatores de risco para o desenvolvimento de EH. A limitação em carboidratos induz à cetose, resultando, não somente na perda de peso, mas, também, na diminuição dos níveis séricos de glicose, insulina e de TAG¹⁶. Dessa forma, constitui-se uma alternativa às dietas tradicionais, restrita em calorias e/ou em gorduras.

A terapia dietética deve ser individualizada para promover conforto ao paciente e minimizar resultados adversos potenciais⁴⁰. Uma paciente submetida à dieta restrita em carboidratos, em nível cetogênico, conhecida como dieta do Dr. Atkins, que enfatiza a seleção de fontes de proteína e de gordura saudáveis (com 54% de proteína, 41% de gordura, 5% de carboidratos e aproximadamente 1.000 kcal/dia), associada a exercícios moderados, por cinco semanas, reduziu rapidamente o teor intra-hepático de TAG¹⁶. A proporção dos macronutrientes dietéticos, intensamente modificada neste caso, associada à restrição energética e aos exercícios, foi decisiva na resposta clínica da paciente. No entanto, deve-se considerar o conforto do paciente, restringindo o tempo de exposição, e as repercussões sobre a perda de peso, nos diferentes estágios da doença hepática, principalmente pelo fato de que alguns estudos evidenciaram que a rápida perda de peso pode exacerbar a inflamação¹⁶.

Além disso, apesar dos resultados promissores, há uma grande preocupação a respeito dos efeitos negativos desta dieta sobre a função renal, a saúde óssea e o risco de câncer. Adicionalmente, alguns estudos mostraram que dietas restritas em carboidratos resultam em uma incidência mais elevada de constipação, cefaléia, halitose, diarreia e astenia. Efeitos adversos sobre o perfil lipídico sérico, a função renal e a saúde cardiovascular, não foram investigados nestes estudos¹⁶.

Um baixo índice glicêmico (IG), por sua vez, está associado com uma menor ingestão alimentar e menor peso corporal. Além disso, uma baixa carga glicêmica (CG) parece estar associada a um adequado perfil lipídico sérico e a baixas concentrações de proteína C-reativa, em pessoas com sobrepeso e

obesidade, o que sugere que os efeitos metabólicos de carboidratos dietéticos podem ser particularmente importante nas pessoas insulino-resistentes⁸.

Alimentos de elevado IG podem exacerbar a deposição de gordura hepática, através de múltiplos mecanismos, relacionados ao controle recíproco do metabolismo da glicose e de AG no fígado e em outros tecidos. Indivíduos insulino-resistentes, que consomem alimentos de elevado IG, expõem o fígado simultaneamente à hiperglicemia, que decorre da maior disponibilidade de glicose, e à hiperinsulinemia que deriva de ambos, hiperglicemia e resistência à insulina. Estes dados parecem 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 risco⁸.

Fatores lipotróficos

A colina é uma amina quaternária indispensável para a integridade estrutural. É necessária para a síntese de fosfolípidios, como a esfingomielina e a fosfatidilcolina, essenciais na composição de todas as membranas celulares e de moléculas como as VLDL, necessárias à exportação de AG do hepatócito, exercendo ação lipotrófica. Sua deficiência promove o acúmulo hepático de TAG⁴¹⁻⁴³.

Embora muitos alimentos contenham colina, há variações na exigência dietética de seres humanos, que pode ser explicada por polimorfismos genéticos comuns. Quando privados, a maioria dos homens e das mulheres pós-menopausadas desenvolvem sinais de esteatose hepática⁴⁴.

No estudo de Raubenheimer et al.⁴⁵, com ratos alimentados com dieta deficiente em colina e rica em gordura, foi observada exacerbação da EH. Além disso, evidenciou-se que o acúmulo de gordura hepática, *per si*, não causou

resistência à insulina, durante a alimentação rica em gordura, e que a deficiência de colina pode desviar o excesso de AGL dietéticos, potencialmente tóxicos para o organismo, para o armazenamento hepático, na forma de TAG.

Veteläinen et al.⁴³, por sua vez, observaram que ratos alimentados com dieta deficiente em colina desenvolveram EH microvesicular, com células inflamatórias ocasionais, obesidade, dislipidemia e resistência à insulina. No mesmo estudo, os autores constataram que o consumo de dieta deficiente em colina e metionina, aminoácido precursor de colina, promoveu EH macrovesicular, com progressão para EHNA, ausência de dislipidemia e de alterações na homeostase insulínica, além de redução do peso corporal. Portanto, do ponto de vista das alterações histológicas, a infiltração gordurosa hepática induzida por dieta deficiente em colina foi menos complicada que aquela induzida por dieta deficiente em colina e metionina, caracterizada por inflamação progressiva e fibrogênese, em ratos.

Antioxidantes

O mecanismo exato da progressão de EH para EHNA é desconhecido. A hipótese mais aceita atualmente é a de Day & 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 (primeiro *hit*), favorecendo a lipólise no tecido adiposo, aumenta excessivamente o aporte de AGL para o fígado, podendo resultar em EH⁴⁶. O primeiro *hit* deixa o hepatócito mais vulnerável ao segundo *hit*, agressões promovidas por vírus, álcool, LPS, dentre outros, os quais promovem estresse oxidativo hepático, levando à EHNA, à cirrose e ao hepatocarcinoma.

Outro modelo, defendido por Wanless & 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 & 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 cirrose⁴⁷.

A peroxidação lipídica, mediada pelas EROS, parece ser o elo entre EH e EHNA. Dois aldeídos produzidos na peroxidação são os principais mediadores, o malondialdeído (MDA), que ativa o fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, o NFκB, promovendo a produção de TNFα, interleucina 8 (IL8) e selectina E; e o 4-hidroxinonal, que ativa as células estreladas hepáticas, promovendo a deposição de colágeno e a conseqüente fibrose^{4,46}. A depleção de antioxidantes, que inativam as EROS, aumentam os efeitos deletérios na mitocôndria, devido à elevação da peroxidação lipídica. A combinação de peroxidação lipídica e produção de citocinas pró-inflamatórias resulta na morte do hepatócito¹⁶.

Níveis sistêmicos aumentados de MDA e depleção das defesas antioxidantes do organismo, representadas pela coenzima Q10 e pelas enzimas superóxido dismutase e catalase, foram observados em homens com EHNA⁴⁸.

O suplemento antioxidante, especificamente de vitamina E, pode ser considerado como uma terapia coadjuvante no tratamento da esteatose²⁸. Foi encontrada uma correlação entre níveis séricos reduzidos de vitamina E e níveis elevados de TAG, fatores prognósticos negativos que causam a progressão da doença. Cankurtaran et al.⁴⁹ verificaram que pacientes portadores de EH, com níveis séricos baixos de vitamina E, não responderam a uma dieta hipocalórica

clássica. Madan et al.⁵⁰, por sua vez, observaram que dieta com suplemento de 400UI de vitamina E pareceu ser eficaz na normalização dos níveis de ALT, em pacientes com EH. No entanto, outros estudos não evidenciaram benefícios do suplemento de vitamina E sobre os níveis séricos de ALT, na DFGNA^{51,52}.

No estudo de Harrison, que avaliou a histologia hepática de 45 pacientes suplementados com vitaminas E (1000UI/dia) e C (1000mg/dia) ou placebo, observou-se significativa redução do quadro de EHNA e da fibrose hepática²⁸. Entretanto, na possibilidade de efeitos adversos pelo consumo excessivo de vitamina E, cujo limite superior de suplementação é de 670UI de α -tocoferóis para adultos⁵³, tais doses não podem ser recomendadas para o tratamento da DFGNA, fora do âmbito das experimentações clínicas.

Segundo uma revisão de Chang et al.⁵⁴, avaliando o uso de agentes antioxidantes e citoprotetores na EH e EHNA, os antioxidantes podem ser eficazes no tratamento de EHNA ativa, com atenuação dos efeitos secundários, embora haja reduzido número de estudos conclusivos a respeito. Não foram demonstrados benefícios adicionais, quando comparados ao uso de dietas com restrição calórica. Apesar de promissor, o uso de antioxidantes deve ser, portanto, mais investigado, principalmente em terapias combinadas.

CONCLUSÃO

A EH é uma entidade patológica do fígado muito comum no mundo ocidental, principalmente por causa do aumento considerável da incidência de doenças como a obesidade e o *diabetes mellitus* tipo 2. Embora não haja tratamento medicamentoso específico, várias evidências apontam a eficácia da dieta e do exercício físico no tratamento de pacientes com EH. A abordagem terapêutica deve ser direcionada aos fatores metabólicos associados, como a

obesidade, a intolerância à glicose, e as dislipidemias. Secundariamente, deve impedir a lesão hepática progressiva, principalmente naqueles pacientes considerados em situação de risco.

As modificações dietéticas e de estilo de vida devem, portanto, ser a primeira linha de intervenção em pacientes com EH ou EHNA, com ou sem excesso ponderal. Restrição calórica e cuidados com a qualidade e a quantidade de carboidratos e lipídios ofertados devem ser especialmente observados. Outras intervenções dietéticas, como o uso de antioxidantes, apesar de promissoras, ainda necessitam de estudos que garantam a sua eficácia e segurança.

REFERÊNCIAS

1. Arrospide M T. Hígado graso no alcohólico. Rev Gastroenterol Perú. 2003; 23 (1): 49-57.
2. 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.
3. Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, de Freitas LA, Barreto D, Gouveia L, Landeiro L. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005; 17 (8): 837-41.
4. Mc Cullough A. Update on nonalcoholic fatty liver disease – J. Clin Gastroenterol. 2002; 34(3):255-62.
5. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2005; 2 (1): 46-53.
6. Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2007; 17 (1):63-70.
7. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough A J, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome. Diabetes. 2001; 50:1844-1850.

8. 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.
9. Herselman MG, Labadarios D, Rensburg CJV, Haffejee AA. Nutrição nas doenças do fígado. In: Gibney M J, Elia, M, Ljungqvist O, Dowsett J. editores. *Nutrição clínica*; 2007.
10. Browning J D, Horton J D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:147-152.
11. Poniachik TJ, Mancilla C A, Contreras J B, Csendes A J, Smok G S, Cavada G CH, Rojas J C, Oksenberg D R, Burdiles PP, Maluenda F G, Díaz J CJ. Obesidad: factor de riesgo para esteatohepatitis y fibrosis hepática. *Rev Méd Chile*. 2002; 130: 731-736.
12. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli A J, Shulman G I. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem*. 2004; 279, (31): 32345-32353.
13. Nagao K, Inoue N, Wang YM, Shirouchi B, Yanagita T. Dietary Conjugated Linoleic Acid Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Zucker (fa/fa) Rats. 2005; *J. Nutr.* 135:9-13.
14. Adams L A, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease *Can. Med. Assoc. J.*, 2005; 172: 899 - 905.
15. Tilg H, Kaser A. Treatment strategies in nonalcoholic fatty liver disease *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2005; 2 (3):148-55.
16. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005; 42(1):44-52.
17. Clark JM. Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006; 40(3):39-43.
18. Tock L, Prado WL, Caranti DA, Cristofalo DM, Lederman H, Fisberg M, Siqueira KO, Stella SG, Antunes HK, Cintra IP, Tufik S, de Mello MT, Damaso AR. Nonalcoholic fatty liver disease decrease in obese adolescents after multidisciplinary therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18 (12): 1241-5.
19. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, Hashimoto O, Tsuji R, Tamaki Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol*. 1997; 27 (1):103-7.
20. Miranda AR, Busquets EB, Gutiérrez AE. La dieta terapéutica en la esteatosis hepática. *Rev. Cubana Aliment Nutr.* 1999;13(2):118-22.

21. Utzschneider KM, Kahn S E. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(12): 4753-4761.
22. Adams L A, Angulo P. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2006; 82:315-322.
23. Oliveira CPM. Função hepática - metabolismo das bilirrubinas FUGESP Revista de Hepatologia, 2000. Reprodução eletrônica disponível em: www.fugesp.org.br.
24. Unicamp Esteatose hepática [acessado em: 2007 Set 20] disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/taesteatose>
25. Gawrieh S, Opara EC, Koch TR. Oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and antioxidant therapies. *J Investig Med*. 2004; 52 (8): 506-14.
26. Cinar K, Coban S, Idilman R, Tuzun A, Sarioglu M, Bektas M, Erden E, Bozkaya H, Ozden A. Long-term prognosis of nonalcoholic fatty liver disease: is pharmacological therapy actually necessary? *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21 (1): 169-73.
27. Roberts EA, Yap J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Approach in the Adolescent Patient. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2006; 9 (5): 423-31.
28. Harrison SA. New treatments for nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol*. 2006; 8 (1): 21-9.
29. Colicchio P, Tarantino G, del Genio F, Sorrentino P, Saldalamacchia G, Finelli C, Conca P, Contaldo F, Pasanisi F. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Ann Nutr Metab*. 2005; 49 (5): 289-95.
30. Lee YM, Choi JS, Kim MH, Jung MH, Lee YS, Song J. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets *Nutrition*. 2006; 22 (9): 956-64.
31. Vajro P , Fontanella A, Perna C, et al. Persistent hyperaminotransferasemia resolving after weight reduction in obese children. *J Pediat*. 1994;125:239–41.
32. Franzese A , Vajro P, Argenziano A, et al. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig Dis Sci*. 1997; 42:1428–32.
33. Andersen T , Gluud C, Franzmann MB, et al. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J Hepatol*. 1991; 12:224–9.
34. Thomas EL, Brynes AE, Hamilton G, Patel N, Spong A, Goldin RD, Frost G, Bell JD, Taylor-Robinson SD. Effect of nutritional counselling on hepatic,

- muscle and adipose tissue fat content and distribution in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006; 12 (36): 5813-9.
35. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Lehrke M, Hendler RE, Shulman G. Reversal of Nonalcoholic Hepatic Steatosis, Hepatic Insulin Resistance, and Hyperglycemia by Moderate Weight Reduction in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:603-608.
 36. Yki-Jarvinen H. Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med*. 2005; 37 (5): 347-56.
 37. Werner A, Havinga R, Bos T, Bloks VW, Kuipers F, Verkade HJ. Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; 288: 1150-1158.
 38. 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.
 39. Gill HK, Wu GY. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: effects of weight loss and a review of popular diets. Are low carbohydrate diets the answer? *World J Gastroenterol*. 2006; 12 (3):345-53.
 40. Browning JD, Davis J, Saboorian MH, Burgess SC. A low-carbohydrate diet rapidly and dramatically reduces intrahepatic triglyceride content. *Hepatology*. 2006; 44 (2): 487-8.
 41. Zeisel SH. Choline: An essential nutrient for humans. *Nutrition*. 2000; 16:7-8.
 42. Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicalli M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats in fed a choline-deficient. *J Nutr*. 2000;130(9):2131-6.
 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: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr*. 2006; 26:229-50.
 45. Raubenheimer PJ, Nyirenda MJ, Walker BR. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2006; 55(7): 2015-20.
 46. Day CP, James OFW. Steatohepatitis a tale of two "hits"? *Gastroenterol*. 1998; 114:842-4.

47. 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. *Sem Liver Dis.* 2004; 24:99-106.
48. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100 (4): 850-5.
49. Cankurtaran M, Kav T, Yavuz B, Shorbagi A, Halil M, Coskun T, Arslan S. Serum vitamin-E levels and its relation to clinical features in nonalcoholic fatty liver disease with elevated ALT levels. *Acta Gastroenterol Belg.* 2006; 69 (1): 5-11.
50. Madan K, Batra Y, Gupta DS, Chander B, Anand Rajan KD, Singh R, Panda SK, Acharya SK. Vitamin E-based therapy is effective in ameliorating transaminasemia in nonalcoholic fatty liver disease. *Indian J Gastroenterol.* 2005; 24 (6): 251-5.
51. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, et al. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology.* 2003;38:413–19.
52. Vajro P, Mandato C, Franzese A, et al. Vitamin E treatment in pediatric obesity-related liver disease: a randomized study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004; 38:48–55.
53. US NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (USA). Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington DC: National Academy Press, 2000.
54. Chang CY, Argo CK, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Therapy of NAFLD: antioxidants and cytoprotective agents. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40 (3) S51-60.

2º artigo: artigo de resultados

SILVA, MAF; ATAIDE, TR; OLIVEIRA, SL; SANT'ANA, AEG; CABRAL JR., CR; BALWANI, MCL; OLIVEIRA, FGS; SANTOS, MC. Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos.

**Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína
contra a esteatose em ratos**

Hepatoproteção da trieptanoína em ratos

Maria A Firmino da Silva
Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas

Terezinha da R Ataíde
Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas

Suzana de L Oliveira
Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas

Antonio E de Sant'Ana
Instituto de Química e Biotecnologia/ Universidade Federal de Alagoas

Cyro R Cabral Júnior
Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas

Maria do C L V Balwani
Setor de Patologia/HUPAA/Universidade Federal de Alagoas

Fernanda G S de Oliveira
Nutricionista

Mércia C Santos
Nutricionista

Endereço para correspondência:

Maria Adriana Firmino da Silva

Av. Gustavo Paiva, 3438, bloco 04, Ap 304 – Mangabeiras – Maceió – Alagoas

Cep: 57031-530 – 82-8808-0318 adrianafirmino@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito do consumo crônico de di- e trieptanoína sobre a esteatose hepática (EH), em ratos.

Metodologia: ratos *Wistar* submetidos à dieta AIN-93 com 0, 30 ou 50% de substituição do óleo por óleo rico em di- e trieptanoína, grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀, respectivamente, por nove meses. O grupo Controle recebeu ração Labina®. Analisaram-se histologia e provas de função e lesão hepática, glicemia e perfil lipídico sérico. Realizaram-se análise de variância, teste F, teste de Dunnet e análises de regressão uni- e multivariada ($p < 0,05$).

Resultados: TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀ desenvolveram EH; 80% de casos graves no TAGC₇₀ contra 40% no TAGC₇₅₀. Os pesos absoluto (PAF) e relativo do fígado (PRF) foram maiores em TAGC₇₀ e TAGC₇₃₀ e a glicemia foi maior em TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀, que no Controle. Colesterol total, LDL-c, LDL-c/HDL-c e proteínas totais foram maiores no Controle. O óleo experimental reduziu o PRF e determinou tendência de redução do peso corporal, PAF, percentual de lipídios hepáticos e graus de EH (GHE). As variáveis explicativas para GHE foram peso final, glicemia, albumina, HDL-c, LDL-c, LDL-c/HDL-c, VLDL-c e fosfatase alcalina.

Conclusões: sugere-se que di- e trieptanoína exercem efeito hepatoprotetor contra a EH, em ratos, numa feição dose-dependente.

Termos de indexação: esteatose hepática, dieptanoína, trieptanoína, TCM.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effect of chronic consumption of di- and triheptanoin on hepatic steatosis (HS) in rats.

Methodology: Wistar rats were submitted to a diet AIN-93 with 0, 30 or 50% of its oil substituted with an oil rich in di- and triheptanoin, groups TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ and TAGC₇₅₀ respectively, for nine months. The control group received Labina®. Liver histology, lesion and hepatic function proofs, glycemia and lipid profile, were performed. Variance analyses, F-test, Dunnet's test and uni- and multivariate regression analyses were performed ($p < 0.05$).

Results: TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ and TAGC₇₅₀ developed HS; 80% of severe cases in TAGC₇₀, as against 40% in TAGC₇₅₀. The absolute (ALW) and relative (RLW) liver weights were higher in TAGC₇₀ and TAGC₇₃₀, and glycemia was greater in TAGC₇₃₀ and TAGC₇₅₀, than in the Control. Total cholesterol, LDL-c, LDL-c/HDL-c and total proteins were higher in the Control. The experimental oil reduced RLW and showed a tendency in the reduction of body weight, ALW, percentage of hepatic lipids and the severity of HS. The explanatory variables in relation to HS were final weight, glycemia, albumin, HDL-c, LDL-c, LDL-c/HDL-c, VLDL-c and alkaline phosphatase.

Conclusions: It is suggested that di- and triheptanoin have a hepatoprotector effect against HS, in rats, in a dose-dependant manner.

Term index: hepatic steatosis, diheptanoin, triheptanoin, MCT.

(I) INTRODUÇÃO

No atual contexto de transição nutricional, a esteatose hepática (EH) desperta grande interesse por sua forte ligação com a obesidade, as dislipidemias e o *diabetes mellitus* tipo 2, sendo considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica, cujo principal componente é a resistência à insulina(1-6).

A EH consiste no acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, que atinge 5-40% do peso do órgão(7). É a alteração metabólica hepática mais freqüente e resulta de um desequilíbrio entre a síntese de triacilgliceróis (TAG), a partir de ácidos graxos, e a baixa secreção destes pelo hepatócito na forma de lipoproteínas. Inicialmente, os triacilgliceróis acumulam-se nos hepatócitos por uma ou várias das seguintes vias: aumento do aporte de ácidos graxos livres circulantes, diminuição da β -oxidação e/ou diminuição da síntese ou da secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que é a principal responsável pela secreção de TAG pelo fígado(8).

Apesar de ter sido considerada há muito tempo uma condição benigna, a EH pode progredir para esteato-hepatite (EHNA) e formas mais graves e terminais de doença hepática, como cirrose(9) e carcinoma hepatocelular. Sabe-se que, atualmente, 15-40% dos casos de EH podem evoluir para EHNA e esta pode progredir para cirrose, em 20% dos casos. Acredita-se que muitos pacientes com cirrose criptogênica, em filas de transplante, tenham sido portadores de EHNA não diagnosticada e tratada(10); entretanto, nesses casos, a confirmação da etiologia pode estar comprometida, em virtude da possível ausência de alterações histológicas comuns à EH.

Embora a prevalência verdadeira seja desconhecida(11,12), sabe-se que a EH atinge adultos e crianças(13) e está emergindo como a condição hepática

mais comum no mundo ocidental(12,14). Estimativas sugerem que 20-30% dos adultos em países ocidentais podem ter EH(15) e até 75% dos pacientes com *diabetes mellitus* e obesidade(16).

Embora ainda não exista tratamento farmacológico eficaz para o tratamento da EH, todos os pacientes são encorajados a reduzir a ingestão de gorduras e praticar exercícios físicos regulares, com o objetivo de aumentar o gasto energético diário. Estratégias de intervenção nutricional e controle dos fatores de risco metabólicos associados devem ser avaliadas, visando um melhor prognóstico. No que se refere ao aspecto nutricional, as pesquisas têm buscado estabelecer relações entre a manipulação dietética de nutrientes, especialmente de carboidratos e lipídios, e EH, objeto de preocupação nos quadros de resistência à insulina(11,12,14).

Os lipídios normalmente considerados são os TAG de cadeia longa (TCL), amplamente distribuídos na natureza. Uma outra categoria de lipídios, os TAG de cadeia média (TCM), tem sido empregada em situações clínicas especiais, em virtude de sua rápida digestão, liberando ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no intestino delgado. Os AGCM são mais polares e hidrofílicos que os de cadeia longa (AGCL); logo, sua absorção pelas células epiteliais do intestino é mais rápida(17).

Ao contrário dos AGCL, os AGCM não são significativamente incorporados aos quilomícrons; antes, são transportados via porta-hepática, ligados à albumina, para o fígado. Além disso, apresentam oxidação acelerada durante o repouso e o exercício e prescindem do sistema carnitina palmitoil-transferase para a entrada na matriz mitocondrial, constituindo-se em uma rápida fonte de energia para o organismo(17).

A trieptanoína, ou trienantina, um TCM constituído por três moléculas do ácido graxo enântico (heptanóico; 7:0), tem recebido atenção especial recentemente. Por apresentar uma característica incomum à maioria dos TCM, ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbonos, foi testada no tratamento dietoterápico das desordens metabólicas da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e na deficiência da enzima piruvato carboxilase (18,19). No entanto, são escassos os dados na literatura sobre os efeitos do consumo crônico da trieptanoína, e dos produtos de sua digestão, em estudos experimentais que possam assegurar o consumo humano por tempo indeterminado. Os relatos disponíveis estão restritos a um estudo toxicológico em ratos(20).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as repercussões hepáticas e alterações metabólicas associadas, do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína, em ratos com EH.

(II) MATERIAL E MÉTODOS

Óleo experimental

Uma mistura de ésteres de glicerol com ácido heptanóico foi obtida por síntese química, na ausência de catalisadores. Glicerol (VETEC, Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brazil) e ácido heptanóico (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), em excesso molar de 30%, foram misturados e mantidos à pressão reduzida, a 130°C, sob agitação, por 100 horas. O produto reacional, identificado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, era composto por 64% de trieptanoína, 34% de dieptanoína e 2% de monoheptanoína. Para fins de discussão neste trabalho, o mesmo foi denominado óleo experimental. Os acilgliceróis foram analisados através de cromatógrafo gasoso

Hewlett-Packard (Agilent; Palo Alto, CA, USA), modelo 5890 série II, equipado com coluna HP-I ou HP-5 e detector de ionização de chama. Hidrogênio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 60°C, com acréscimos subseqüentes de 10°C.min⁻¹, até uma temperatura final de 275°C; a temperatura do injetor foi mantida em 250°C. A espectrometria de massas foi determinada a 70 eV em aparelho Finnigan (San Jose, CA, USA), modelo TSQ 70, acoplado ao cromatógrafo gasoso. Adicionalmente, a dieptanoína e a trieptanoína, óleos transparentes, foram identificadas por espectroscopia na região do infra-vermelho com transformada de Fourier (IV-TF; com pastilha de NaCl, num espectrômetro FTIR 1600 Perkin-Elmer) e por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (com solução de CDCl₃ solution, 15 mg mL⁻¹ CDCl₃, num aparelho Bruker a 300 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C). Os dados espectroscópicos foram compatíveis com a estrutura da trieptanoína. A partir dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, a estrutura proposta para o diacilglicerol obtido foi 1,3-dieptanoína. Para detalhes acerca da caracterização, consultar Ataíde et al.(20). O óleo experimental foi armazenado sob refrigeração, protegido da luz, até a elaboração das dietas experimentais.

Animais e dietas experimentais

Ratos *Wistar* machos, recém-desmamados (22 a 26 dias de nascidos), pesando 47,22g±11,79 [m ± DP], provenientes do biotério do Centro Universitário de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS/Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC/Fundação Educacional Jayme de Altavila – FEJAL, foram divididos em três grupos (n=10) identificados de acordo com a dieta oferecida: TAGC₇₀ (dieta AIN-93, do American Institute of Nutrition)(21), TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀ (dieta AIN-93, com 30% e 50% de substituição do óleo de soja pelo óleo

experimental, respectivamente), por nove meses (Tabela 1). Até os dois meses de idade, os animais receberam a versão G (*growth*) da dieta AIN-93; a partir daí até o final do experimento, a versão M (*maintenance*). As dietas, isocalóricas, apresentavam proporções equivalentes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais.

Foram utilizados, ainda, sete ratos machos da mesma linhagem e origem dos demais, aos dez meses de idade, para a obtenção de padrões de referência para análises bioquímicas e histológicas; estes animais, alimentados com a ração comercial para roedores Labina®, constituíram um grupo controle adicional, denominado grupo Controle.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais no biotério de pesquisa (Biotério Setorial) da Faculdade de Nutrição/UFAL, com temperatura ambiente (20 - 24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) controladas, recebendo água e dieta *ad libitum*. Foram distribuídos nas gaiolas por ordem crescente de peso inicial, de modo a evitar diferenças significativas de peso entre os grupos. A evolução ponderal e a ingestão dietética de cada animal foram controladas semanalmente.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL tendo sido aprovado sob número 001316/2002-30, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS/Brasil), baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal, UNESCO, 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

Para efeito de avaliação das condições higiênico-sanitárias do biotério de pesquisa e monitoração dos animais, foram realizados exames parasitológicos de

fezes a cada dois meses de estudo, através do método HPJ de Hoffman et al.(22).

Tabela 1 – Composição das dietas TAGC₇0, TAGC₇30 e TAGC₇50 baseadas nas dietas AIN-93 G (G) para o crescimento e AIN-93 M (M) para a idade adulta dos animais(21)

INGREDIENTES (g/Kg)	DIETAS					
	TAGC ₇ 0		TAGC ₇ 30		TAGC ₇ 50	
	G	M	G	M	G	M
Caseína	200	140	200	140	200	140
Amido de milho Maizena®	497,5	565,7	497,5	565,7	497,5	565,7
Amido dextrinizado	132	155	132	155	132	155
Óleo de soja LIZA	70	40	49	28	35	20
Óleo experimental	-	-	21	12	35	20
Celulose microcristalina	50	50	50	50	50	50
Mistura mineral AIN-93 G	35	-	35	-	35	-
Mistura mineral AIN-93 M	-	35	-	35	-	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3,0	1,8	3,0	1,8	3,0	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
t-butil hidroquinona	0,014	0,008	0,014	0,008	0,014	0,008
Ácido graxo ω -6 adicionado ^a	-	-	3,60	0,84	6,00	4,08
Ácido graxo ω -3 adicionado ^a	-	-	0,60	0,14	1,00	0,68

^a Quantidade adicionada de ácidos graxos das séries ω -6 e ω -3 às dietas experimentais.

Ao final do período de nove meses de exposição às dietas Controle e experimentais, os animais foram mantidos em jejum noturno (12 horas), anestesiados por inalação de éter etílico e submetidos à coleta de sangue do plexo vascular retro-orbital, com auxílio de tubo capilar para microhematócrito. Os animais do grupo Controle foram levados do biotério de origem ao biotério de pesquisa um dia antes do sacrifício, para serem igualmente submetidos ao jejum noturno.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm, por 10 minutos. O soro obtido foi transportado a 10°C e processado no mesmo dia no Laboratório Central Dr. Aristeu Lopes (LACEN), em Maceió – Alagoas. As análises foram realizadas em aparelho TARGA 3000, Biotecnica Instruments S. p. A. (Wiener Lab., Rosário, Argentina), através de *kits* (Synermed International Inc. Westfield, IN, USA).

Foram determinadas as concentrações séricas de: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), fosfatase alcalina (FA), GGT (gama-glutamil transferase), albumina, proteínas totais, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL (HDL-c, *high density lipoprotein cholesterol*), colesterol VLDL (VLDL-c, *very low density lipoprotein cholesterol*), colesterol LDL (LDL-c, *low density lipoprotein cholesterol*) e glicose, para avaliação do efeito do óleo das dietas sobre a função hepática e o perfil lipídico dos animais. As determinações de VLDL-c e de LDL-c foram estimadas pelas fórmulas de Friedewald et al.(23):

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

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

Sacrifício dos animais e coleta do tecido hepático

Após o período experimental, os animais foram sedados e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, procedeu-se a abertura completa da cavidade abdominal e a retirada do fígado. O órgão foi pesado e o lobo maior, lobo esquerdo, seccionado no seu maior diâmetro; o fragmento obtido foi imerso em solução de formol a 10%, para fixação. A porção remanescente foi pesada, congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer a -20°C.

Análise histológica do fígado

Os fragmentos do fígado, fixados em formol a 10%, foram clivados transversalmente e levados ao Centro de Patologia de Maceió – CEPAMA, para o processamento, inclusão em parafina e coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE). As análises histológicas ao microscópio óptico foram realizadas no setor de Patologia do Hospital Universitário da UFAL.

A esteatose hepática foi classificada em cinco graus de acordo com as características histológicas apresentadas (Figura 1).

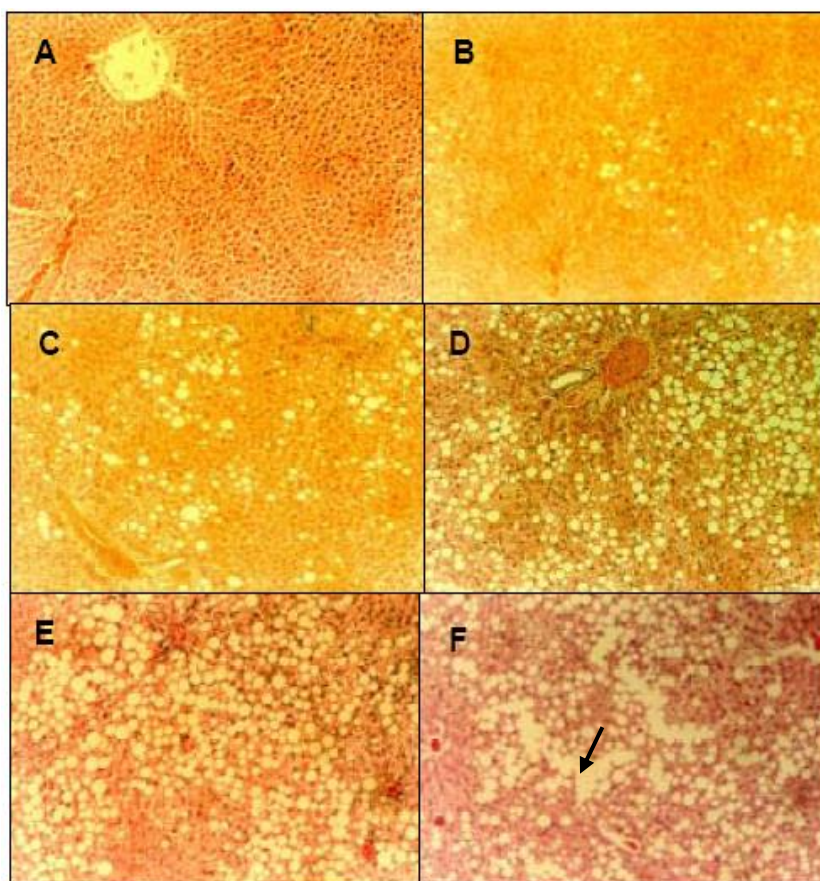


Figura 1 - Cortes histológicos do tecido hepático corados pelo método HE. Esteatose grau 0 - ausência (A), grau 1 - leve (B), grau 2 – levemente moderado (C), grau 3 - moderado (D), grau 4 - grave (E), e grau 5 – grave com presença de pseudocistos (seta) (F), observada nos animais dos grupos Controle, TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀.

Determinação do teor de lipídios totais do fígado e das dietas

A extração e a determinação dos lipídios totais do fígado e das dietas foram realizadas através do método de Bligh & Dyer(24), em amostras congeladas. A adição de água destilada para a extração dos lipídios hepáticos foi reduzida de 8 mL para 2 mL em função da umidade da amostra, estimada em 50%. As análises foram realizadas em duplicata e os extratos obtidos, armazenados sob atmosfera de nitrogênio, em *freezer*.

Análise estatística

Após verificação dos pressupostos de normalidade (teste de Lilliefors; $p < 0,05$) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Durbin-Watson; $p < 0,05$), foram realizadas análise de variância, teste F, teste de Dunnet e análises de regressão uni e multivariada, mantendo-se o nível de significância de até 5 % de probabilidade de erro experimental. A significância dos coeficientes de regressão associados às variáveis explicativas nos modelos uni e multivariados foi determinada através do teste t, com até 10% de probabilidade de erro experimental. As variáveis foram excluídas do referido modelo pelo procedimento *Backward*.

(III) RESULTADOS

A análise histológica do tecido hepático revelou diferentes graus de esteatose macrovesicular nos animais dos grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀ (Tabela 2). Os animais do grupo TAGC₇₀ apresentaram o dobro (80%) do número de casos graves, graus 4 e 5, quando comparados ao grupo TAGC₇₅₀ (40%). Os animais do grupo Controle não apresentaram EH (Tabela 2).

O percentual de lipídios hepáticos revelou níveis muito elevados nos animais com EH, grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀, em relação ao grupo Controle ($p < 0,01$). O peso absoluto do fígado dos animais dos grupos TAGC₇₀ e TAGC₇₃₀ foi significativamente maior que o do grupo Controle ($p = 0,025$ e $0,048$, respectivamente). No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos Controle e TAGC₇₅₀, aquele submetido a maior substituição do óleo de soja pelo óleo experimental. O peso relativo do órgão, peso do fígado/peso corporal, seguiu a mesma tendência, ou seja, foi significativamente maior nos grupos TAGC₇₀ e TAGC₇₃₀, que no grupo Controle ($p = 0,015$ e $0,016$, respectivamente), e não diferiu entre os animais Controle e TAGC₇₅₀. O peso corporal final, em todos os grupos de substituição, não diferiu do Controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios para graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), percentual de lipídios hepáticos (%LH), peso absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos Controle, TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀

VARIÁVEIS	GRUPOS			
	Controle	TAGC ₇₀	TAGC ₇₃₀	TAGC ₇₅₀
GEH	0 ^a	3,6 ± 1,17 ^b	3,6 ± 1,43 ^b	2,9 ± 1,66 ^b
PCF (g)	400,11 ± 74,14 ^a	508,82 ± 107,28 ^a	481,16 ± 82,51 ^a	487,44 ± 98,16 ^a
LH (%)	4,31 ± 1,02 ^a	21,60 ± 9,10 ^b	21,52 ± 8,75 ^b	17,12 ± 8,9 ^b
PAF(g)	11,67 ± 3,40 ^a	19,06 ± 7,06 ^b	18,29 ± 5,28 ^b	16,01 ± 4,79 ^a
PRF	0.028 ± 0,006 ^a	0.037 ± 0,006 ^b	0.037 ± 0,005 ^b	0.031 ± 0,003 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão. Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) pelo teste de Dunnett.

Quanto às variáveis bioquímicas, foram observados níveis glicêmicos significativamente maiores nos animais dos grupos TAGC₇₃₀ ($p = 0,032$) e TAGC₇₅₀ ($p = 0,004$), em relação ao grupo Controle (Tabela 3). As proteínas totais, por sua vez, foram significativamente maiores no grupo Controle, em relação aos demais ($p < 0,001$). De maneira similar, os níveis séricos de colesterol total, de LDL-c e a relação LDL-c/HDL-c foram maiores no grupo Controle

($p \leq 0,01$). Os níveis de HDL-c não diferiram; entretanto, os animais TAGC₇₀ apresentaram tendência de níveis inferiores àqueles do grupo Controle ($p = 0,052$).

Tabela 3 – Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀, TAGC₇₅₀ e Controle

Variáveis bioquímicas	Grupos			
	Controle	TAGC ₇₀	TAGC ₇₃₀	TAGC ₇₅₀
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Glicemia (mg/dL)	94,33 ± 8,70 ^a	110,50 ± 4,71 ^a	115,04 ± 4,67 ^b	121,43 ± 3,83 ^b
Colesterol total (mg/dL)	197,73 ± 13,58 ^a	124,95 ± 8,36 ^b	123,68 ± 12,21 ^b	128,91 ± 9,12 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	116,37 ± 9,50 ^a	97,45 ± 6,83 ^a	102,07 ± 14,64 ^a	104,94 ± 7,83 ^a
LDL-c (mg/dL)	162,27 ± 10,60 ^a	84,41 ± 7,16 ^b	79,74 ± 7,37 ^b	85,34 ± 6,87 ^b
HDL-c (mg/dL)	31,39 ± 3,24 ^a	21,05 ± 1,74 ^a	23,52 ± 3,58 ^a	22,58 ± 2,58 ^a
LDL-c/HDL-c	5,94 ± 0,88 ^a	4,02 ± 0,20 ^b	3,70 ± 0,34 ^b	3,88 ± 0,20 ^b
VLDL-c (mg/dL)	23,27 ± 1,90 ^a	19,48 ± 1,37 ^a	18,18 ± 2,12 ^a	20,99 ± 1,56 ^a
Proteínas totais (g/dL)	9,87 ± 0,96 ^a	6,88 ± 0,09 ^b	6,97 ± 0,11 ^b	6,94 ± 0,14 ^b
Albumina (g/dL)	3,83 ± 0,51 ^a	4,23 ± 0,17 ^a	4,14 ± 0,08 ^a	4,08 ± 0,04 ^a
ALT (U/L)	103,14 ± 7,75 ^a	150,14 ± 24,86 ^a	143,06 ± 16,07 ^a	122,45 ± 16,06 ^a
AST (U/L)	169,28 ± 16,79 ^a	237,8 ± 24,74 ^a	224,65 ± 15,33 ^a	189,70 ± 14,88 ^a
AST/ALT	1,63 ± 0,21 ^a	1,68 ± 0,34 ^a	1,62 ± 0,27 ^a	1,62 ± 0,24 ^a
FA (U/L)	112,11 ± 19,30 ^a	310,14 ± 102,72 ^a	350,84 ± 89,85 ^a	263,65 ± 92,47 ^a
GGT (U/L)	38,87 ± 5,23 ^a	43,50 ± 7,56 ^a	51,32 ± 6,58 ^a	48,77 ± 5,62 ^a

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) pelo teste de Dunnett.

Os níveis de AST também não diferiram entre o grupo Controle e aqueles submetidos aos diferentes níveis de substituição do óleo da dieta; entretanto, também foi observada uma tendência de níveis mais elevados nos animais do grupo TAGC₇₀, em relação àqueles do grupo Controle ($p = 0,051$). As demais variáveis relacionadas à função ou lesão hepática, albumina, ALT, relação

AST/ALT, GGT e FA, não diferiram significativamente entre o grupo Controle e os demais (Tabela 3).

Algumas variáveis apresentaram correlação linear positiva com a esteatose hepática, como peso final ($r=0,6$; $p<0,001$), glicemia ($r=0,42$; $p=0,01$), peso absoluto do fígado ($r=0,7$; $p<0,001$), peso relativo do fígado ($r=0,69$; $p<0,001$), percentual de lipídios hepáticos ($r=0,845$; $p<0,001$), fosfatase alcalina ($r=0,43$; $p<0,01$), ALT ($r=0,34$; $p=0,03$) e AST ($r=0,37$; $p=0,02$).

Os níveis séricos de proteínas totais apresentaram correlação linear negativa significativa com os graus de EH ($r=-0,580$; $p<0,001$) e com outras variáveis intimamente relacionadas ao acúmulo hepático de TAG, como: fígado total ($r=-0,49$; $p=0,003$), fígado relativo ($r=-0,53$; $p=0,001$) e percentual de lipídios hepáticos ($r=-0,54$; $p=0,001$).

Algumas variáveis, que apresentaram correlação linear simples de *Pearson* com a esteatose, quando avaliadas pela regressão linear univariada, revelaram uma tendência de decréscimo ($p\geq 0,05$) à medida que o óleo experimental foi adicionado à dieta: GHE, peso final, peso absoluto do fígado e lipídios hepáticos (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D, respectivamente). O peso relativo do fígado decresceu ($p=0,039$) e a glicemia elevou-se ($p<0,001$) com a adição do óleo experimental (Figura 2E e 2F respectivamente).

Na figura 2A, em relação aos níveis de substituição do óleo experimental nas dietas (0, 30 e 50%), evidenciou-se que a cada 1% de adição houve decréscimo de 0,012 no GEH, com grau de ajuste do modelo regressivo univariado de 65,58%; ou seja, valores estimados iguais a 0,00, 0,36 e 0,60 para 0, 30 e 50% de substituição, respectivamente.

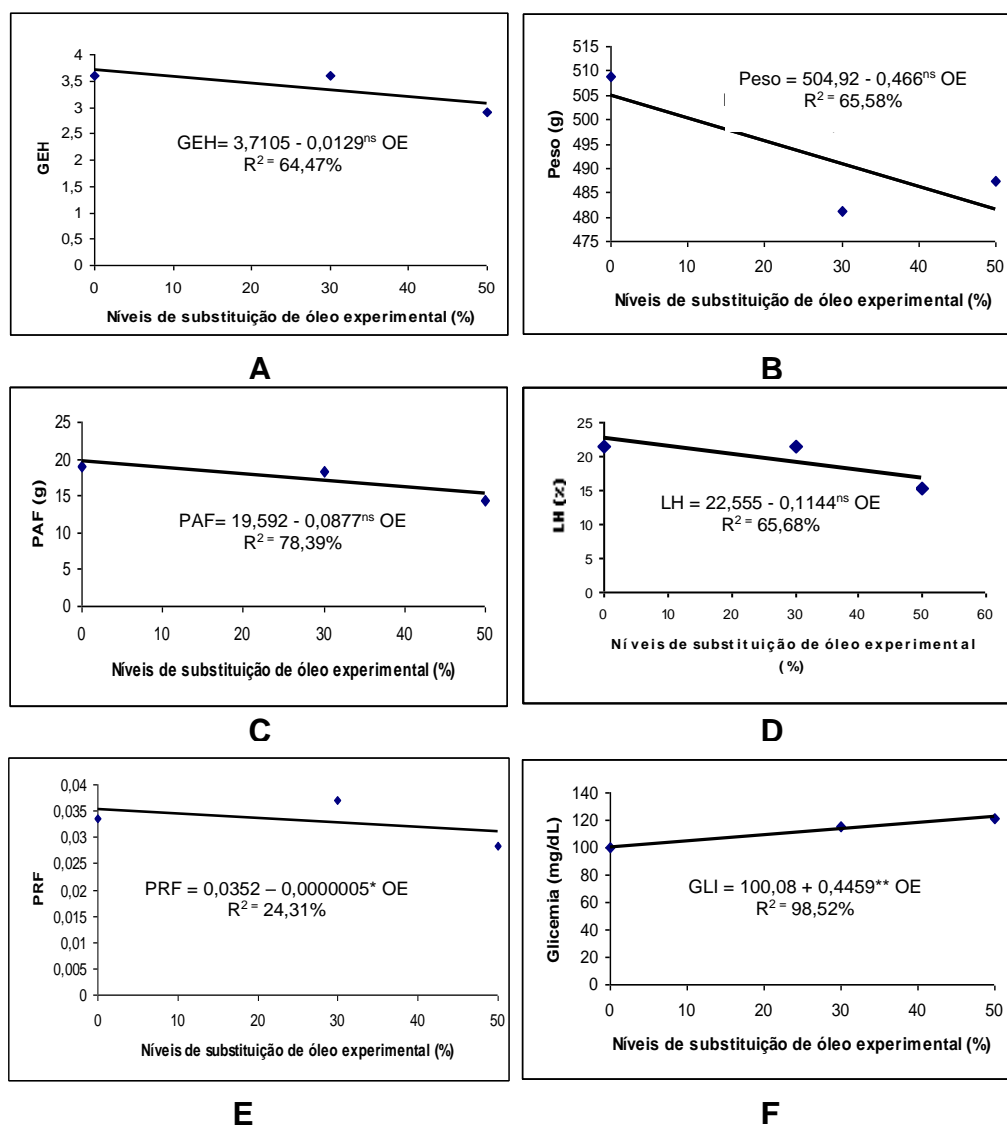


Figura 2 – Análises de regressão linear simples e coeficientes de determinação (R^2) para as variáveis grau de esteatose hepática (GEH) (A); peso final (peso) (B); peso absoluto do fígado (PAF) (C); lipídios hepáticos (LH) (D); peso relativo do fígado (PRF) (E); e glicemia (F).

A mesma situação foi observada em relação ao peso final dos animais, que foi reduzido em 0,46g para cada 1% de adição do óleo experimental, correspondendo a um total de 14g de redução para TAGC730 e 23,3g para TAGC750. Outras variáveis intimamente relacionadas com a EH, para as quais foram estimadas médias através da equação de regressão linear univariada (Tabela 4), também apresentaram decréscimo dose dependente da adição do

óleo experimental; os melhores resultados, à exceção da glicemia, foram observados com 50% de substituição.

Tabela 4 – Médias estimadas para os grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀, TAGC₇₅₀ pela equação de regressão linear univariada para grau de esteatose hepática (GEH), peso corporal, peso absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado, percentual de lipídios hepáticos (LH) e glicemia

VARIÁVEL	MÉDIAS ESTIMADAS		
	TAGC ₇₀	TAGC ₇₃₀	TAGC ₇₅₀
GEH	3,7	3,3	3,1
Peso corporal (g)	504,9	490,9	481,6
PAF (g)	19,6	17,0	15,2
LH (%)	22,6	19,1	16,8
PRF	0,0352	0,0351	0,351
Glicemia (mg/dL)	100,1	113,5	122,4

Desta forma, um modelo de regressão linear multivariado foi criado para explicar o relacionamento do conjunto de variáveis que influenciaram significativamente (teste t; $p < 0,1$) a variável GEH apresentada pelos animais:

$$\text{GEH}_{\text{estimado}} = 1,751 + 0,010^{**} \text{PF} - 0,033^{\Delta} \text{GLI} - 1,241^{\Delta} \text{ALB} + 0,246^{*} \text{HDL} \\ - 0,061^{*} \text{LDL} + 1,703^{*} \text{LDL/HDL} - 0,102^{*} \text{VLDL} + 0,002^{*} \text{FA}$$

onde:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ e $\Delta p \leq 0,10$.

PF = peso final do animal;

GLI = glicemia

ALB = albumina

HDL-c = colesterol HDL

LDL-c = colesterol LDL

LDL-c/HDL-c = relação LDL-c/HDL-c

VLDL-c = colesterol VLDL

FA = fosfatase alcalina

O modelo de regressão linear multivariado apresentou como média estimada 1,75 para a variável dependente GEH. Em relação ao PF houve um acréscimo linear de 0,01 ponto percentual no GEH estimado ($p < 0,01$). Para a glicemia, houve um decréscimo linear de 0,03 ($p < 0,1$). O mesmo ocorreu para as variáveis explicativas: albumina, LDL-c e VLDL-c, cujos decréscimos nos GEH foram iguais a 1,24 ($p < 0,1$), 0,06 ($p < 0,05$) e 0,1 ($p < 0,05$). Entretanto, observou-se um incremento linear para HDL-c (0,25; $p < 0,05$), relação LDL-c/HDL-c (1,7; $p < 0,05$) e FA (0,002; $p < 0,05$).

O grau de ajuste do modelo regressivo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) igual a 69,3%.

(IV) DISCUSSÃO

Na investigação das razões pelas quais os animais de diferentes grupos do presente estudo apresentaram EH macrovesicular, deve ser descartada a hipótese de toxicidade do óleo experimental, visto que até mesmo aqueles do grupo TAGC70 desenvolveram a lesão. Adicionalmente, apresentaram o dobro do número de casos graves de EH, em relação ao observado no grupo TAGC750, situação ratificada pela análise de regressão linear simples, que mostrou que o acréscimo do óleo experimental reduziu a gravidade da EH em 10 e 16,6%, para 30 e 50% de substituição, respectivamente, evidenciando um potencial efeito protetor do óleo rico em triptanoína, na gravidade da EH. Um surto de infecção

viral ou fatores ambientais outros que pudessem ter desencadeado o fenômeno devem ser igualmente descartados, dada a ausência de EH no grupo Controle.

Vários fatores podem estar relacionados ao efeito protetor observado; dentre eles, deve-se considerar que os produtos da digestão da di- e da trieptanoína, por serem constituídas por AG de cadeia média (AGCM), não são significativamente incorporados nos quilomicrons(25). Além disso, os AGCM são mais solúveis em água, mais rapidamente oxidados durante o repouso e o exercício e são transportados para a matriz mitocondrial independentemente do sistema carnitina palmitoil-transferase (CPT), constituindo-se rápida fonte de energia, com predomínio da termólise em detrimento da termogênese, em contraste com os AG de cadeia longa (AGCL). Portanto, os AGCM têm menor eficiência energética, produzindo 8,3kcal/g contra as 9Kcal/g, em média, para os AGCL. Todas estas características metabólicas contribuem para uma menor deposição gordurosa a partir dos TCM da dieta, razão pela qual têm sido utilizados na perda de peso, durante dieta hipocalórica(17,25).

Adicionalmente, um grupo de pesquisadores demonstrou, em ratos, que a deposição aguda ou crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação lipídica, ou seja, que o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da EH(26). Por esta razão, os animais do grupo TAGC₇₀, que receberam dieta cuja fonte de lipídios era exclusivamente o óleo de soja, e apresentou 80% de casos graves de EH, contra 40% no grupo TAGC₇₅₀, possivelmente estava sob maior risco, uma vez que a peroxidação lipídica constitui o segundo *hit*, na hipótese de Day & James de evolução de EH para EHNA(27).

A EH está normalmente associada à obesidade, à intolerância à glicose e/ou à hiperinsulinemia e à hipertrigliceridemia, com ou sem redução dos níveis

de HDL. É, considerada, atualmente, um componente da síndrome de resistência à insulina (RI) e o componente hepático da síndrome metabólica(28,29) pois, estados de RI promovem as condições predisponentes para a infiltração gordurosa no fígado(30,31,32).

Apesar da estreita relação entre RI, obesidade e EH, a avaliação do peso corporal final dos animais não revelou diferenças significativas entre os grupos de animais com diferentes níveis de substituição dietética e o grupo Controle. No entanto, foi observada correlação linear positiva altamente significativa entre peso final e graus de EH ($r=0,6$; $p<0,001$) e efeito redutor da substituição dietética pelo óleo experimental sobre o ganho de peso corporal.

O percentual de lipídios hepáticos, conforme o esperado, foi significativamente mais elevado nos animais com EH, que naqueles do grupo Controle. Entretanto, a análise do peso do fígado dos animais, variável altamente correlacionada com os graus de EH, mostrou que a substituição pelo óleo experimental no nível de 50%, grupo TAGC750, resultou em peso absoluto e relativo do órgão semelhante aos animais do grupo Controle.

Estudos sugerem que a lipogênese hepática aumentada é uma anormalidade metabólica importante subjacente à patogênese da EH, especialmente nos fígados insulino-resistentes. A lipogênese aumentada pode causar alterações metabólicas que conduzem ao teor hepático aumentado de TAG. A primeira alteração é direta: a síntese aumentada dos TAG; a segunda, indireta: a produção aumentada de malonil-CoA, que inibe a CPT-1 e a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, reduzindo, assim, a β -oxidação e contribuindo para o acúmulo de AG e de TAG no fígado(17,25).

Desta forma, o acúmulo de lipídios no hepatócito pode ser resultante também da inibição da CTP-1; assim, o uso de di- e trieptanoína pode ter contribuído para a redução da gravidade do fenômeno através desse mecanismo, uma vez que fornecem AGCM, que prescinde do transporte da carnitina.

Curiosamente, os níveis glicêmicos dos animais que receberam o óleo experimental, grupos TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀, foram significativamente maiores que os do grupo Controle. A elevação foi diretamente relacionada ao nível de substituição dietética. Alguns estudos relacionam a ingestão de TCM à melhoria da captação de glicose, mediada pela insulina. Eckel et al.(33) submeteram indivíduos diabéticos tipo 2 a uma dieta rica em TCM, para observar o efeito sobre o metabolismo da glicose. A quantidade de glicose necessária para a manutenção da glicemia, durante a infusão constante de insulina, foi aumentada em 30% nesses indivíduos. Acredita-se que a administração de TCM pode ser uma estratégia dietética promissora para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2, que constitui um dos fatores envolvidos na etiologia da EH(25). As razões pelas quais o óleo experimental promoveu elevação da glicemia podem estar relacionadas às suas propriedades anapleróticas, estimulando a gliconeogênese a partir da produção de succinil-CoA, oriundo do propionil-CoA, fornecendo oxaloacetato.

Apesar da prevalência de hiperlipidemia, especialmente hipertrigliceridemia, na DFGNA ser variável, de 20 a 92%, e o excesso de colesterol contribuir com a elevação do acúmulo hepático de lipídios(34), o perfil lipídico sérico, particularmente os níveis de colesterol total, LDL-c e relação LDL-c/HDL-c, foram mais elevados no grupo Controle, que naqueles que apresentaram EH. Os níveis de TAG e VLDL-c, no entanto, não diferiram entre os grupos experimentais com EH e o Controle. Isto ratifica o trabalho de

Gauthier(35), que levantou a hipótese de que o fígado age como um amortecedor sistêmico, aumentando seu percentual de lipídios e prevenindo a elevação sérica de TAG.

Os níveis de HDL-c no grupo TAGC₇₀ apresentaram uma tendência de redução, quando comparados com o grupo Controle ($p=0,051$). Parece existir uma relação inversa entre os níveis de HDL-c e a intensidade da EH(33), o que poderia explicar tal achado.

Uma observação interessante neste estudo, que pode contribuir para a discussão do quadro de EH encontrado, relaciona-se aos níveis séricos de proteínas totais. Os animais que receberam a dieta AIN-93, com ou sem substituição pelo óleo experimental, apresentaram níveis significativamente mais reduzidos de proteínas totais, quando comparados ao Controle ($p<0,001$). No entanto, esta diferença pode não representar significado fisiológico importante, pois os níveis encontrados nos grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀ estão dentro de padrões de referência(35,36) e, os do grupo Controle, pouco acima deles.

Os valores de proteínas séricas totais variam, conforme o método aqui adotado (Synermed®), de acordo com a idade, o sexo e a dieta consumida. Uma vez que os animais eram todos de mesma idade e sexo, resta a variável dieta a ser analisada. As dietas baseadas na AIN-93 tinham a caseína como fonte protéica, suplementada com aminoácido sulfurado, nos teores de 20% e 14%, para os períodos de crescimento e idade adulta dos animais, respectivamente. A dieta controle, por sua vez, era composta por farinha de peixe suplementada com aminoácido, não especificado no rótulo do produto, com proporção mínima de proteína bruta de 23%, do desmame até a idade adulta dos animais, o que pode

ter contribuído com as diferenças entre os níveis de proteínas séricas totais aqui observadas. Apesar do exposto, foi observada correlação negativa significativa ($r=-0,58$; $p<0,001$) entre proteínas totais e graus de EH, que merece investigação adicional, apesar de não haver associação estabelecida entre lesão hepática e níveis séricos de proteínas totais.

Uma vez que os níveis séricos de albumina não diferiram entre os grupos submetidos à substituição dietética e o grupo Controle, pode-se sugerir ausência de diminuição da capacidade de síntese do hepatócito, com preservação da função hepática, apesar das alterações observadas nos animais com EH.

Apesar de, atualmente, a EH ser a principal causa de elevação das aminotransferases(37), os níveis séricos de ALT, AST, relação AST/ALT, e, ainda, FA e GGT, não diferiram entre os animais do grupo Controle e os dos grupos TAGC₇₀, TAGC₇₃₀ e TAGC₇₅₀. Observou-se, apenas, uma tendência de níveis de AST mais elevados nos animais TAGC₇₀ ($p=0,051$).

As aminotransferases estão presentes, em altas concentrações, no músculo, fígado e cérebro. A elevação da atividade dessas enzimas no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos(37). Segundo Ockner(38), a elevação dos níveis da ALT é relativamente específica da doença hepatobiliar. Apesar dos níveis de AST poderem estar aumentados nas doenças de outros órgãos, valores mais de 10 vezes acima do limite superior de variação normal refletem, habitualmente, uma patologia hepática ou biliar. Os valores das aminotransferases são úteis para monitorar a evolução da hepatopatia parenquimatosas aguda ou crônica. A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito, enquanto que 80% da AST está presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de

doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, enquanto em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT(39).

Na EH as provas de lesão hepática são variáveis podendo até mesmo não apresentar nenhuma anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Os níveis de ALT podem se apresentar levemente aumentados, até duas vezes, e, os de AST, até cinco vezes, especialmente nos graus mais intensos de metamorfose gordurosa(40). Isto poderia justificar a ausência de diferenças significativas entre os animais que apresentaram ou não EH, neste estudo.

A causa mais comum de elevação da GGT sérica é a hepatopatia ativa; sua atividade é afetada tanto pela lesão aguda da célula hepática quanto pela obstrução do trato biliar(40). Além da colestase, a GGT encontra-se elevada nas lesões hepáticas inflamatórias e nos casos em que a atividade do citocromo P-450 tenha sido induzida pelo álcool ou outras substâncias tóxicas(40). A ausência de elevação dos níveis de GGT nos grupos submetidos à substituição dietética corrobora com a afirmação de ausência de efeito tóxico do óleo experimental.

Embora os níveis de FA não tenham diferido, observou-se correlação positiva significativa com graus de EH ($r=0,43$; $p<0,01$), o que permitiu sugerir uma influência da infiltração gordurosa sobre os níveis de FA, neste estudo.

O modelo de regressão linear multivariado adotado revelou que as variáveis de maior relação com os graus de EH aqui observados foram: peso final, diretamente proporcional, conforme esperado; glicemia, de maneira curiosa, inversamente proporcional, contrastando com a relação clássica entre EH observada na ausência de uso abusivo de álcool e glicemia; e, albumina, LDL-c e

VLDL-c, inversamente proporcionais aos GEH. É importante considerar que a VLDL é a lipoproteína responsável pela exportação de TAG do fígado(8).

Variáveis outras, como a distribuição de macronutrientes e o teor dietético de aminoácidos sulfurados e de fatores lipotróficos, devem ser igualmente considerados na discussão da etiologia do quadro de EH, neste estudo. Nosso grupo de investigação tem observado EH em ratos alimentados com a dieta AIN-93, em diferentes contextos (dados não publicados), sugerindo problemas com a sua composição, possivelmente no tocante à proporção de carboidratos e proteínas e à quantidade adicionada de aminoácidos sulfurados e colina, reconhecido fator lipotrófico. As razões pelas quais a dieta AIN-93 tem promovido EH, no entanto, necessitam ser esclarecidas. A mesma parece induzir alterações relacionadas ao ganho de peso corporal e à deposição hepática de lipídios, traduzidas pelo peso absoluto e relativo do órgão, atenuadas, neste estudo, pela adição do óleo experimental, especialmente no maior nível de substituição.

(V) CONSIDERAÇÕES FINAIS

O quadro de EH aqui observado parece ter sido induzido pela dieta padrão adotada, AIN-93, por razões não inteiramente esclarecidas, possivelmente relacionadas à sua composição em macronutrientes, particularmente carboidratos e proteínas, aminoácidos sulfurados ou agentes lipotróficos. Tal quadro foi atenuado pela oferta do óleo experimental, principalmente no maior nível de substituição dietética.

Portanto, o consumo crônico de di- e trieptanoína, num contexto de substituição parcial do óleo da dieta, não promoveu efeito hepatotóxico, em ratos;

antes, evidenciou-se um efeito hepatoprotetor contra a EH nesses animais, numa feição dose-dependente.

REFERÊNCIAS

1. Arrospide M T. Hígado graso no alcohólico. **Rev Gastroenterol Perú.** **2003**; 23 (1): 49-57.
2. Kang H, Greenson Jk, Omo Jt, Chao C, Peterman D, Anderson L, et al. 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.
3. Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, Freitas LA, Barreto D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** **2005**; 17(8): 837-41.
4. McCullough A. Update on nonalcoholic fatty liver disease. **J. Clin Gastroenterol.** **2002**; 34(3):255-62.
5. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.** **2005**; 2 (1): 46-53.
6. Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** **2007**; 17 (1):63-70.
7. Herselman MG, Labadarios D, Rensburg CJV, Haffejee AA. Nutrição nas doenças do fígado. In: Gibney M J, Elia, M, Ljungqvist O, Dowsett J. **Nutrição clínica.** 1st edition. Rio de Janeiro, 2007:150-176.
8. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med.** **2002**; 346(16):1221-31.
9. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath P. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenetic cirrhosis: a case –control study. **Hepatology.** **2000**; 32:689-92.
10. Caldwell SH, Oelsner DH, Lezzoni JC, Hespdenheide EE, Battle EH, Drscobel CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and a risk factors for underlying disease. **Hepatology.** **1999**; 661-669.
11. Nagao K, Inoue N, Wang YM, Shirouchi B, Yanagita T. Dietary Conjugated Linoleic Acid Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Zucker (fa/fa) Rats. **J. Nutr.** **2005**;135:9-13.
12. Adams L A, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. **Can. Med. Assoc. J.** **2005**; 172: 899 - 905.

13. Poniachik TJ, Mancilla C A, Contreras J B, Csendes A J, Smok G S, Cavada G CH, et al. Obesidad: factor de riesgo para esteatohepatitis y fibrosis hepática. **Rev Méd Chile.** **2002**; 130:731-736.
14. Tilg H, Kaser A. Treatment strategies in nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.** **2005**; 2 (3):148-55.
15. Clark JM. Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Gastroenterol.** **2006**; 40(3):39-43.
16. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. **J Biol Chem.** **2004**; 279, (31): 32345-32353.
17. Barreiro Maa, Villar Mea, Suazo Fm. Triglicéridos de cadena media en el tratamiento de obesidad. **Revista de salud pública y nutrición.** [periódico eletrônico] 2004 [citado em dez 2004 10] 5 (2). Disponível em: <http://www.respyn.uanl.mx/v/2/articulos/art.tcm.htm>.
18. Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F, Brunengraber H, Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. **J Clin Invest.** **2002**; 110(2):259-69.
19. Mochel F, Pascale DGT, Henri B, Kiman RP, Robier D, Chales R, et al. Pyruvate carboxilase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. **Molecular Genetics and Metabolism.** **2004**; 84: 305-302
20. Ataíde, TR, Lima, MRF, Valentim, IB, Pinheiro, DM, Sant'Ana, AEG. Chemical synthesis of tricaproin, trienantin and tricapylin. **Intern. J. Food Sci. Technol.** **2007**; 42:1504-1508.
21. 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.
22. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. **Journal Publ. Health & Trop. Med.** **1934**; 9:283-298.
23. 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.
24. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extration and Purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** **1959**; 37:911-917.
25. Ferreira AMD, Barbosa PEB, Ceddia RB. A influência da suplementação de triglicérideos de cadeia média no desempenho em exercícios de ultra-resistência. **Rev Bras Med Esporte.** **2003**;9(6):413-419.

26. Reis KAA, Roquete MLV, Penna Fj. Esteatohepatite não-alcoólica na infância e adolescência: revisão. **Pediatria**. 2001; 23(4): 329-39.
27. Day CP, James OFW. Steatohepatitis a tale of two "hits"? **Gastroenterol**. 1998; 114:842-844.
28. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell, GC. NASH and insulin resistance: insulin hipersecretions and association with the insulin syndrome. **Hepatology**. 2001; 35(2):373-79.
29. Busetto L, Tregnaghi A, Marchi F, Segato G, Foletto M, Sergi G, Favretti F, Lise M, Enzi G. Liver Volume and Visceral Obesity in Women with Hepatic Steatosis Undergoing Gastric Banding. **Obesity research**. 2002; 10 (5):408-411.
30. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. **Ann Intern Med**. 2005; 143:722-8.
31. Sanyal Aj, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo Wb, Contos Mj, Sterling Rk, Luketic Va, Shiffman MI, Clore Jn. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**. 2001; 120:1183-92.
32. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2006; 50(2): 230-238.
33. Eckel RH, Hanson AS, Chen Ay, Berman JN, Yost TJ, Brass EP. Dietary substitution of medium chain triglycerides improves insulin-mediated glucose metabolism in NIDDM subjects. **Diabetes**. 1992; 41:641-7.
34. Parise ER, Santos VN. Importância clínica da esteatose hepática. In: Castro LP, Savassi-Rocha PR, Filho JG, Lima AS. **Tópicos em gastroenterologia**. 9th. Belo Horizonte: 1999; 473-8.
35. 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.
36. Harkness JE, Wagner EJ. **Biologia clínica de coelhos e roedores**. 3Ed Ed Roca, 1993.
37. Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. **Harper: bioquímica**. 7th.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994.
38. Ockner, R. K. 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.

39. Motta, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, 2003.
40. Ravel R. Laboratório Clínico. **Aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer deste trabalho, procurou-se evidenciar, através dos artigos de revisão e de resultados, estratégias dietéticas que podem ser utilizadas no tratamento e na prevenção da progressão da esteatose hepática, situação clínica que tem aumentado significativamente em todo o mundo.

Dentre os importantes fatores envolvidos no aumento da incidência da EH está a resistência à insulina, provavelmente o elo entre a obesidade, o *diabetes mellitus* tipo 2 e a síndrome metabólica, que refletem as recentes mudanças no perfil nutricional da população. A terapêutica dietética, que no contexto desta dissertação é colocada como tratamento e prevenção do agravamento da EH, deve ser analisada numa perspectiva de prevenção de fatores que levam ao aumento da incidência destas doenças. A frase de Hipócrates, “*somos o que comemos*”, tão atual, embora date de 500aC, ilustra o fato de que não é possível o tratamento eficaz destas morbidades sem considerar a terapêutica nutricional.

No caso da EH, especialmente por não existir tratamento medicamentoso específico, a terapêutica nutricional é fundamental, associada ao exercício físico, com abordagem direcionada aos fatores metabólicos adjacentes, como a obesidade, a intolerância à glicose e as dislipidemias. Deve, ainda, contribuir para a prevenção da progressão da lesão hepática, principalmente naqueles pacientes considerados em situação de risco.

Várias são as propostas dietéticas que se revelam promissoras, a exemplo da restrição calórica, do controle da oferta de carboidratos e lipídios da dieta e do uso de fatores lipotróficos e antioxidantes. Adicionalmente, o uso de dieptanoína e trieptanoína, que revelaram um potencial efeito protetor contra a esteatose, em ratos, neste estudo, deve ser mais investigado, inclusive como coadjuvante no tratamento combinado com outros fatores dietéticos e mudanças no estilo de vida.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herselman MG, Labadarios D, Rensburg CJV, Haffejee AA. Nutrição nas doenças do fígado. In: Gibney M J, Elia, M, Ljungqvist O, Dowsett J. editores. Nutrição clínica. 2007; 156-157.
2. Ludwig J, Viggiano JR, McGill DB. Non alcoholic steatohepatitis. Mayo Clinical experiences with a hitherto unnamed hepatitis. Mayo Clin Proc. 1980; 55:434-438.
3. McCullough A. Update on nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin Gastroenterol. 2002; 34(3):255-62.
4. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. N Engl J Med. 2002; 346(16):1221-31.
5. Marchesini G, Brizzi M, Morselli-Labate, Bianchi G, Bugiasini E, MacCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of non-alcoholic fatty liver with insulin resistance. Am J Medicine. 1999; 107:450-5.
6. Angulo P, Keach JC, Balts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with non alcoholic steatohepatitis. Hepatology. 1999, 30(5):1356-62.
7. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca f, dePetris N, Cassader m, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto m. Non alcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome. Further evidence for an etiologic association. Hepatology. 2002; 35(2): 367-72.
8. Caldwell SH, Oelsner DH, Lezzoni JC, Hespeneide EE, Battle EH, Driscoel CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and a risk factors for underlying disease. Hepatology. 1999:661-669.
9. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath P. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenetic cirrhosis a case –control study. Hepatology. 2000; 32:689-92.
10. Yang S Q, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. Proc Natl Acad Sci. 1997: 94(6):2557-62.
11. Day CP, James OFW. Steatohepatitis a tale of two “hits”? Gastroenterol. 1998; 114:842-4. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell, GC. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretions and association with the insulin syndrome. Hepatology. 2001; 35(2):373-79.
12. Kang H, Greenon 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.
13. Kadayifci A, Merriman RB. Metformin, vitamin E, and diet for patients with nonalcoholic fatty liver disease. Am J Gastroenterol. 2006; 101 (6):1396-7.

14. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100 (4): 850-5.
15. Ataíde, TR., Lima, MRF, Valentim, IB, Pinheiro, DM, Sant'Ana, AEG. Chemical synthesis of tricaproin, trienantin and tricapylin. *Intern. J. Food Sci. Technol.* 2007; 42:1504-1508.
16. Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H, Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest.* 2002; 110(2):259-69.
17. Mochel F, Pascale DGT, Henri B, Kiman RP, Robier D, Chales R, Roe J, Saudubray M, Pyruvate carboxilase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2004; 84: 305-302.