



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - IQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA - PPGQB

JULIANA CÉLIA DE FARIAS SANTOS

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO
NO DANO HEPATOCELULAR EM RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A DIETAS
DEFICIENTES EM FATORES LIPOTRÓFICOS

Maceió-AL

2014

JULIANA CÉLIA DE FARIAS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO
NO DANO HEPATOCELULAR EM RATOS *Wistar* SUBMETIDOS A DIETAS
DEFICIENTES EM FATORES LIPOTRÓFICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca
Goulart

Co-orientadora: Profa. Dra. Iara Barros Valentim

Maceió-AL
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

S237a Santos, Juliana Célia de Farias.
Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação no dano hepatocelular em ratos wistar submetidos a dietas deficientes em fatores lipotróficos / Juliana Célia de Farias Santos. – 2014.

143 f. : il., gráfs. e tabs.

Orientadora: Mar[ília Oliveira Fonseca Gourlart.

Co-orientador: Iara Barros Valentim.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia. f. 129-143.

1. Produtos finais de glicosilação. 2. Fígado gorduroso. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 542.06:612.351



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

ATA DE DEFESA DE TESE DA DOUTORANDA JULIANA CÉLIA DE FARIAS SANTOS.

Aos quatorze (14) dias do mês de maio de 2014, às 9:15 hrs, na Sala de Reuniões IQB/UFAL, reuniu-se a Comissão Examinadora de **Defesa de Tese** da doutoranda **Juliana Célia de Farias Santos**, composta pelos Professores Doutores: Marília Oliveira Fonseca Goulart (Orientador, PPGQB/IQB/UFAL), Iara Barros Valentim (Coorientador, IFAL/Maceió), Hugo Juarez Vieira Pereira (PPGQB/IQB/UFAL), Sônia Salgueiro Machado (IQB/UFAL), Daniel Pens Gelain (ICBS/UFRGS), Emiliano de Oliveira Barreto (PPGCS/UFAL). Após a apresentação oral por 60 minutos do trabalho intitulado "**Avaliação de Biomarcadores de Estresse Oxidativo e Inflamação no dano Hepatocelular em Ratos Wistar submetidos a dietas deficientes em fatores Lipotróficos**", a doutoranda foi em seguida arguida pela Banca Examinadora, durante 2 hora (s) e _____ minutos. Reunidos em sessão secreta, os membros da Comissão deliberaram pela APROVAÇÃO da doutoranda, fazendo jus ao título de **Doutora em Ciências**, na Área de Concentração Biotecnologia e Sub-área de Concentração _____ pelo Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. E sem mais para relatar, eu, Marília Oliveira Fonseca Goulart, assino a presente Ata em comum acordo com os demais membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr^a. Marília O. F. Goulart

Prof. Dr^a. Iara Barros Valentim

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Prof. Dr^a. Sônia Salgueiro Machado

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

ADENDO:

Dedico este trabalho a:

- ♥ Ao meu pai, Durval Heleno (*in memoriam*) e à minha mãe, Maria José
- ♥ Ao meu marido, Evaldo Peixoto e minha amada filha, Camila Peixoto

AGRADECIMENTOS

A Deus, que trilhou todo este caminho;

A minha orientadora Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, por toda sua confiança, ensinamentos, apoio e carinho. Uma pessoa que a vida colocou no meu caminho para que eu aprendesse a ser uma pessoa e profissional melhor.

A Dra. Iara Barros Valentim, minha co-orientadora, grande amiga e conselheira, pessoa fundamental no desenvolvimento de todas as etapas do nosso projeto, meu muito obrigada.

As Professoras da Faculdade de Nutrição (UFAL), Ms. Fabiana Andréa Moura, Dra. Glaucivane da Silva Guedes e Dra. Terezinha da Rocha Ataíde que, em momentos diferentes, contribuíram para construção deste trabalho.

Ao grupo do “estresse oxidativo”, doutorando Orlando Roberto Pimentel e IC’s Kívia Queiroz e John Marques. Juntos implantamos um novo grupo de pesquisa e construímos uma bela amizade, sem vocês nada disto seria possível.

A toda família da eletroquímica/UFAL onde pude passar algum tempo da minha vida no meio de pessoas maravilhosas, em especial a Fabrícia Ferreira, Gabriela Corti, Camila Calado, Fátima Santos, Jadriane Xavier, Mônica Santos, Thaissa Lúcio, Andréa Cláudia, Leonardo Vieira “Leozinho” e Angladis Vieira. No doutorado pude conhecer pessoas que levo para uma vida inteira. Agradeço também ao apoio da Profa. Dra. Fabiane Caxico e ao carinho do Aldy.

Às amigas Gau, Fabi e Taciana Guedes, a amizade de vocês me fortalece.

Ao Prof. Dr. Daniel Gelain e alunos João Paulo, André Simões Pires e Juciano Gasparotto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela parceria na realização de análises desta tese e pelo acolhimento durante o momento em que estávamos na UFRGS.

Aos Professores do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (UFAL), Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto e Profa. Dra. Salete Smaniotto, e ao doutorando Cícero Fagner pelo apoio nas análises histológicas deste trabalho. Em especial, à Profa. Dra. Salete Smaniotto, todos nossos momentos de discussão foram enriquecedores.

À Faculdade de Nutrição e as responsáveis pelo biotério setorial, Profa. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde e Profa. Dra. Suzana Lima que nos cederam o espaço para realização da parte experimental desta tese.

Aos amigos da FANUT, Luitgard Lima, Mônica Lopes, Tahiná Pêsoa e Ana Heloísa que durante o tempo que fui professora desta instituição sempre me apoiaram no doutorado.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart que nos acolheu em seu laboratório durante todas as fases da pesquisa.

Ao Dr. João Gomes da Costa pelo apoio nas análises estatísticas.

A todos professores e componentes da pós-graduação do Instituto de Química e Biotecnologia (UFAL), em especial aqueles que participaram da minha banca de qualificação Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira, Prof. Dra. Janaína Herbele Bortoluzzi e Dr. Jaim Simões.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

E às agências financiadoras FAPAL e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo

RESUMO

Introdução: A indução da doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA), em modelos experimentais, tem sido realizada por meio da utilização de drogas, manipulação genética ou dietética. Dietas deficientes em fatores lipotróficos são capazes de ocasionar as diversas fases da DFGNA e por isso vêm sendo utilizadas rotineiramente pela comunidade científica. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) estão envolvidos com a DFGNA, corroborando para a evolução da doença. Além disso, a interação de AGEs com seus receptores específicos (RAGE) contribui para a manutenção de um ciclo vicioso entre a glicação, o estresse oxidativo (EO) e o processo inflamatório. O objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos de dietas deficientes em fatores lipotróficos no dano hepatocelular em modelos animais.

Metodologia: Setenta ratos machos *Wistar*, aos 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram acondicionados no Biotério Setorial da FANUT (20-24°C; ciclo claro/escuro de 12 h), por 30 dias (estudo agudo). Os animais foram subdivididos em grupos (n=10) e submetidos a diferentes dietas: uma dieta controle comercial (Cont) (Nuvilab®) e as outras dietas purificadas, confeccionadas a partir da dieta do *American Institute of Nutrition* (AIN), na versão 93, indutoras da DFGNA. Estas formulações foram divididas em: AIN-93Pp (AIN-93 em pó); AIN-93Ppel (AIN-93 em peletes); AIN-93DCp (AIN-93 em pó; deficiente em colina); AIN-93DCpel (AIN-93 em peletes; deficiente em colina); AIN-93DCCp (AIN-93 em pó; deficiente em colina e cistina), AIN-93DCCpel (AIN-93 em peletes; deficiente em colina e cistina). O perfil redox em extratos hepáticos foi avaliado por meio de análise de proteínas carboniladas, tióis totais, TBARS e atividades de catalase e SOD. A quantificação de RAGE, IL-1 β e TNF- α foi realizada por *Western Blot*. Utilizou-se o teste de *Tukey*, considerando um nível de significância de 5% e a correlação de *Pearson*, para a análise estatística.

Resultados e Discussão: O grupo Cont apresentou níveis mais elevados de tióis totais, catalase e SOD e menores concentrações de proteínas carboniladas e TBARS, representativo de equilíbrio redox. As proteínas carboniladas são marcadores de dano hepatocelular precoce, uma vez que seus níveis estiveram aumentados, em relação ao grupo controle, a partir dos grupos padrão (semelhante aos demais grupos). Em relação aos valores de tióis totais, houve comportamento oposto, com diminuição de sua concentração nos grupos padrão, confirmando o decréscimo da defesa antioxidante. Os níveis de TBARS estiveram aumentados nos grupos deficientes (DC e DCC), independente da formulação das dietas e as enzimas antioxidantes, diminuídas. A expressão de RAGE foi mais elevada nos grupos DCp e DCCp; para IL-1 β e TNF- α encontraram-se níveis mais elevados de IL-1 β apenas no grupo DCp, enquanto o TNF- α esteve diminuído no grupo DCCpel, ambos em relação ao grupo controle. **Conclusão:** As concentrações dos biomarcadores de EO foram maiores nos grupos deficientes em aminoácidos lipotróficos, independente da intensidade do dano hepatocelular. A expressão/quantificação de RAGE e IL-1 β , para o dano hepático induzido no estudo, foi mais significativa nos animais alimentados com as dietas em pó.

Palavras-Chave: Produtos Finais de Glicosilação, Fígado Gorduroso, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: The induction of non-alcoholic fatty liver (DFGNA) disease, in experimental models,

has been accomplished through the use of drugs, or by dietary or genetic manipulation. Diets deficient in lipotropic factors can cause the various stages of DFGNA and therefore have been used routinely by the scientific community. Advanced glycation end products (AGEs) and reactive oxygen and nitrogen species (ERONs) are involved with DFGNA, corroborating to the evolution of the disease. Furthermore, the interaction of AGEs with their specific receptor (RAGE) contributes to maintaining a vicious cycle of glycation, oxidative stress (OS), and inflammation. The objective of this study was to evaluate effects of diets deficient in lipotropic factors in hepatocellular damage in animal models. **Methods:** Seventy male Wistar rats of 21 days of age, from the Central Animal UFAL were kept in the vivarium of FANUT Sector (20-24 °C, light / dark cycle of 12 h) for 30 days (acute study). The animals were divided into groups (n = 10) and subjected to different diets: a commercial control diet (Cont) (Nuvilab ®) and other purified diets, made from the diet of the American Institute of Nutrition (AIN) in the version 93, inducers of DFGNA. These formulations were divided into: AIN-93Pp (powdered AIN-93); AIN- 93Ppel (AIN-93 in pellets); AIN-93DCp (powdered AIN-93; deficient in choline); AIN-93DCpel (AIN-93 in pellets; deficient in choline); AIN-93DCCp (powdered AIN-93; deficient in choline and cystine), AIN- 93DCCpel (AIN-93 in pellets; deficient in choline and cystine). The redox profile in liver extracts was evaluated by analysis of protein carbonyls, total thiols, TBARS and catalase and SOD activities. Quantification of RAGE, IL-1 β and TNF- α was performed by Western Blot. We used the Tukey test, considering a significance level of 5% and Pearson correlation for statistical analysis. **Results and Discussion:** The Cont group showed higher levels of total thiols, catalase and SOD and lower concentrations of protein carbonyls and TBARS, representing redox balance. The protein carbonyls are markers of early hepatocellular damage, since their levels were increased in relation to the control group, even from the default groups (similar to the other groups). In relation to the values of total thiols, a different behavior was evidenced, with a decrease in their concentration in both default groups, confirming the decrease of antioxidant defense. TBARS values increased in deficient groups (DC and DCC), regardless the formulation of diets, while antioxidant enzymes decreased. The expression of RAGE was higher in groups DCp and DCCp; higher levels of IL-1 β was observed only in DCp group, while TNF- α level was shown to be lower in DCCpel group, both compared to the control group. **Conclusion:** The concentration of biomarkers of OS was higher in the aminoacid lipotropic deficient groups, independent on the intensity of hepatocellular damage. The expression/ quantification of RAGE and IL-1 β for induced liver injury in the study was more significant in animals fed with powdered diets.

Keywords: Glycosylation End Products, Fatty Liver, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Componentes da DFGNA e mecanismos de evolução. A DFGNA é composta por EH, EHNA e cirrose, sendo fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepático. A primeira etapa é composta pela esteatose ou acúmulo de gordura no fígado; a segunda etapa pela inflamação da EHNA e a terceira pela morte do hepatócito. Alterações histológicas: (1) EH: esteatose hepática, acúmulo de gordura na célula hepática, sem evidência de injúria hepatocelular ou fibrose; (2) EHNA: presença de esteatose hepática, infiltrado inflamatório e hepatócitos balonizados, com ou sem fibrose; (3) Cirrose: caracterizado por fibrose extensa, desorganização da arquitetura lobular e vascular e presença de nódulos de hepatócitos em regeneração. A DFGNA é fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepático (4). 30
- Figura 2 - Desenvolvimento da esteatose hepática e sua associação com a SM. 1: Excesso de peso/obesidade leva à RI nos tecidos extra-hepáticos, resultando em hiperglicemia e aumento do influxo de AGL para o sangue, fatores comuns no desenvolvimento de componentes-chave da SM (hipertensão, obesidade / dislipidemia, diabetes tipo 2). Semelhante a DFGNA. A DFGNA também aumenta os níveis de glicose e da liberação de AGL para o sangue, contribuindo para a manutenção da RI; 2: *Input*- excesso dietético de glicose/frutose e hiperglicemia, aumentam a síntese de lipídios via LDN e o aumento da gordura dietética e lipólise do tecido adiposo exacerbam a RI, aumentando a lipogênese. *Output* corresponde a uma disfunção mitocondrial oxidativa e prejuízo da formação de VLDL. Na EH os processos apresentam disfunção..... 33
- Figura 3 - Formação de AGEs de açúcares redutores. Ataque nucleofílico no carbono anomérico do açúcar por Lisina presente em proteínas, formando produtos de Amadori. Alterações metabólicas que podem causar o aumento de produtos Amadori são hiperglicemia (reação de *Maillard*), hipertrigliciridemia e aumento da gordura no tecido adiposo (peroxidação lipídica com formação de reativos carbonílicos e compostos dicarbonílicos), processos comuns em obesos e diabéticos

tipo 2. Após sucessivos deslocamentos do grupo carbonila através do esqueleto de carbono do açúcar, o intermediário α -dicarbonila didesoxi-inosina é formado. O intermediário α -dicarbonílico sofre ataque nucleofílico intramolecular sobre o grupo carbonila pelo ϵ N, dando aldimina, um precursor plausível para o *cross-linking* Lisina-Arginina, glicosepane..43

Figura 4 - Intermediários de produtos de glicação avançada. A decomposição oxidativa de produtos de Amadori leva à formação de uma grande variedade de compostos reativos carbonílicos e dicarbonílicos. Estes intermediários de produtos de glicação incluem glioxal, metilglioxal, 1-desoxiglicosona, 3-desoxiglicosona. IPGs pode também ser produzidos por autooxidação da glicose ou, no caso do glioxal e metilglioxal, por peroxidação de lipídios.....44

Figura 5 - Peroxidação lipídica e formação de AGEs. O radical hidroxila sequestra um átomo de hidrogênio do carbono sp^3 bis- α lípico do lipídio conjugado, formando um radical de carbono e, em seguida, na presença de oxigênio, forma um radical peróxido, que é reduzido na presença de outro AGL para formar peróxido lipídico, que cicliza e gera peróxido cíclico, que na presença de oxigênio sofre quebra com formação de glioxal, que reage com a lisina formando a CML.....46

Figura 6 - Produtos de glicação avançada.48

Figura 7 - Estrutura e função de RAGEs. A família da RAGEs é composta por diferentes isoformas do receptor, entre os mais comuns, RAGE celular e sRAGE (RAGE solúvel). O sRAGE tem a capacidade de se ligar a AGEs sanguíneos e outras moléculas específicas impedindo a interação destes com receptores celulares, envolvidos com o estresse oxidativo. A geração e acúmulo de AGEs pode ser evidenciado durante a hiperglicemia, envelhecimento, inflamação, estresse oxidativo, isquemia e reperfusão. A ligação dos AGEs com RAGE leva à sinalização do domínio citoplasmático da mDia1 (em células do sistema cardiovascular), resultando na ativação da NADPHox e geração de EROs. Em células hepáticas, este processo ainda é uma hipótese. Outra forma de produção de EROs, na esteatose hepática, ocorre através da disfunção mitocondrial. A consequência do aumento da

NADPHox e da disfunção das mitocôndrias é o consumo das defesas antioxidantes e da glicoxalase, acentuando o estresse oxidativo e os níveis de AGEs do meio. AGEs aumentados recrutam a expressão de células inflamatórias que expressam RAGE. Estas, quando ativadas, liberam ligantes de RAGE não-AGE, como *S100/calgranulins* e HMGB1 (*high mobility group box 1*). Ambos, ligantes de RAGE não-AGE se AGEs podem ocasionar uma amplificação funcional do RAGE, levando ao aumento de AGEs, da inflamação e do estresse tecidual, como resposta ao dano. Reparo tecidual é estimulado pela ativação, principalmente, de células estreladas com fibrogênese hepática e apoptose de hepatócitos, contribuindo para a evolução do dano hepático.....51

Figura 8 - Estresse oxidativo e expressão de RAGE hepático. Formação de EROs por redução de um elétron na etapa do O_2 . $O_2^{\cdot-}$ é formado em grande quantidade através da respiração mitocondrial. Durante dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 é formado. H_2O_2 também pode ser formado em peroxissomos. Se NO estiver presente, irão reagir para formar $ONOO^{\cdot-}$ e $ONOOH$. O peroxinitrito pode então reagir com o dióxido de carbono para gerar, em cascata, espécies hábeis para realizar nitração. No fluido extracelular, as CK e neutrófilos são fontes de $O_2^{\cdot-}$, e neutrófilos liberam a enzima MPO para produzir $OCl^{\cdot-}$ a partir do peróxido de hidrogênio e cloreto. A presença de RAGE em hepatócitos e CHE aumenta o estresse oxidativo hepático.....54

Figura 9 - Sistema enzimático antioxidante. Na esteatose hepática e na resistência à insulina, ocorre aumento da oferta de acetil-CoA para oxidação mitocondrial, com aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, este pode ser reduzido a partir da SOD, com geração de H_2O_2 ; O H_2O_2 pode ser reduzido para H_2O pelo sistema das glutatonas ou reduzido para H_2O e O_2 pela CAT. O $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem ser oxidados pela Reação de Haber- Weiss ou Reação de Fenton a OH^{\cdot} , aumentando a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas e ao DNA.57

Figura 10 - Peroxidação lipídica e sistema antioxidante não-enzimático.58

Figura 11 - Etapas para a formação de poliols e de EROs. Glicose na presença de AR e NADPH é reduzida, formando sorbitol e $NADP^+$; sorbitol é

oxidado na presença de SDH e NAD⁺, formando frutose e NADH. Durante a redução da glicose a sorbitol, em conjunto, a glutathione oxidada é reduzida a duas moléculas de glutathione pela glutathione reductase, na presença de NADPH. Em condições de maiores quantidades de glicose para redução a sorbitol, níveis mais baixos de NADPH estão disponíveis para a reação de redução da glutathione oxidada a glutathione, com um aumento de EROs. Quando de uma maior oxidação do sorbitol a frutose, haverá uma maior disponibilidade de NADH que, na presença de NADH oxidase e de oxigênio, provoca uma maior libertação de ânion radical superóxido, com consequente aumento de EROs.....60

Figura 12 - Evolução da esteatose hepática a esteato-hepatite: papel dos AGEs e estresse oxidativo, um ciclo vicioso. Obesidade está associada com RI (A) e inflamação (B). (A): RI provoca alterações metabólicas responsáveis pelo desenvolvimento de esteatose hepática. Oxidação de gordura está aumentada, com maior reação de beta-oxidação e atividade mitocondrial. O aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons leva à disfunção mitocondrial com subsequente formação de EROs; o O₂^{•-} formado pode ser reduzido por sistemas enzimáticos para H₂O₂ (SOD) e por reação subsequente (GPx) à água; entretanto, esta reação com os metais de transição, como Fe²⁺, pode levar à formação do [•]OH, com um ataque subsequente à membrana celular, resultando em peroxidação de lípidos (PL), em organelas intracelulares. Peroxidação lipídica: (1) Fonte de compostos reativos dicarbonílicos (intermediários reativos da glicação) que formam AGEs; (2) Ativação do sistema inflamatório e propagação via aumento do EO. Interação AGEs/ RAGE aumenta a formação de EROs, estes mecanismos levam ao dano oxidativo, depleção de ATP, morte celular, fibrose e progressão da doença hepática. (B) Citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo são direcionadas ao fígado, fortalecendo a ativação das CK inflamatórias juntos às EROs, com a ativação de células estreladas hepáticas, contribuindo para o agravamento da fibrose.....62

Figura 13 - Diferentes modelos dietéticos indutores da DFGNA. Dietas deficientes em fatores lipotróficos (DC e DCM) impedem a via normal de produção de VLDL por retirada de colina e metionina da via de produção da fosfatidilcolina, constituinte da membrana desta lipoproteína; ocasionando acúmulo de TAG hepático, PL e EO; Estas dietas também diminuem a oferta de cisteína para a produção de glutathiona tornando o órgão mais susceptível ao EO. Dietas ricas em fatores lipogênicos (DCAF, DRG e DRC) estimulam a produção dos fatores que regulam a expressão gênica de enzimas lipotróficas, ChREBP e SREBP-1c, aumentando a síntese de triacilgliceróis no hepatócito com consequente PL e EO.	66
Figura 14 - Associação entre o metabolismo da colina, metionina, cisteína/cistina e glutathiona. 1- a metionina, um aminoácido essencial, é ativada pelo ATP para formar S-adenosil-metionina, em uma reação catalisada pela MAT; 2- posteriormente a SAME, por meio da metilação da fosfatidiletanolamina, forma fosfatidilcolina e S-adenosil-homocisteína, numa reação catalisada por PEMT. A S-adenosil-homocisteína, um subproduto dessa reação, é hidrolisado pela enzima SAH hidrolase, gerando homocisteína. A homocisteína tem dois destinos metabólicos: remetilação ou transulfuração. Na remetilação, a homocisteína adquire um grupo metila da N5-metilTHF (reação intermediada pela MS) ou da betaína (reação intermediada pela BHMT) para formar metionina. Na transulfuração, o enxofre é transferido para serina, numa reação dependente de PLP e CBS; 3- após a formação de cistationa outras reações em cadeia serão realizadas até a formação de glutathiona.....	72
Figura 15 - Sacrifício dos animais.	84
Figura 16 - Fluxograma do tratamento dado ao tecido hepático para realização das análises do perfil redox.	85
Figura 17 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo controle. Aumento 30x.	93
Figura 18 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo controle. Aumento 40x.	93
Figura 19 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Padrão AIN 93 9P). Aumento 20x.....	94

Figura 20 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Padrão AIN 93 (P). Aumento 30x.....	94
Figura 21 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DC (deficiente em colina AIN 93). Aumento 20x.	95
Figura 22 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DC (deficiente em colina AIN 93). Aumento 40x.	95
Figura 23 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DCC (deficiente em colina e cistina AIN 93). Aumento 20x.	96
Figura 24 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DCC (deficiente em colina e cistina AIN 93). Aumento 30x.	96
Figura 25 - Concentração de TBARS em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos..	108
Figura 26 - Concentração de proteínas carboniladas em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos..	110
Figura 27 - Concentração de tiois totais em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos..	112
Figura 28 - Concentração de catalase em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos..	114
Figura 29 - Concentração de SOD em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos.	115
Figura 30 - Imunoblot com β -actin como controle interno e quantificação gráfica de IL-1 β , RAGE e TNF-alfa em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. (A) expressão de RAGE, IL-1 β , TNF-alfa, β -actin; quantificação de (B) RAGE, (C) IL-1 β , (D) TNF-alfa.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças: descrição e critérios diagnósticos de doenças relacionadas à doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA).....	31
Tabela 2 - Doenças crônico degenerativas relacionadas com os AGEs.	40
Tabela 3 - Composição da dieta comercial.	80
Tabela 4 - Composição da dieta AIN-93 nas versões AIN-93P, AIN-93DC e AIN-93DCC.....	81
Tabela 5 - Peso corporal final (PCF), peso absoluto do fígado (PAF) e peso relativo do fígado (PRF) nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.	101
Tabela 6 - Variáveis bioquímicas séricas nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.....	103
Tabela 7 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão de RAGE, IL-1 β , TNF- α e o perfil redox hepático nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.....	120
Tabela 8 – Estudo de correlação de Pearson entre o perfil redox hepático e a bioquímica sérica nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.	122
Tabela 9 - Estudos de experimentação animal relacionados ao dano do tecido hepático e à DFGNA registrados na literatura, com desenho experimental semelhante ao do presente trabalho.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

γ -GT	Gama-glutamil transferase
ϵ N	Azoto terminal de lisina
ABS	Absorvência
ACC	Acetil-CoA sintase
ACL	ATP citrato liase
AGE-R1	AGE receptor 1
AGE-R2	AGE receptor 2
AGE-R3	AGE receptor 3
AGEs	Produtos de glicação avançada, do <i>inglês advanced glycation end products</i>
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	Instituto Americano de Nutrição, do inglês <i>American Institute of Nutrition</i>
AIN-76 diet	Dieta do AIN na versão 76
AIN-93 diet	Dieta do AIN na versão 93
AIN-93DCCp	Dieta AIN 93 deficiente em colina e cistina na forma de pó
AIN-93DCCpel	Dieta AIN 93 deficiente em colina e cistina na forma de peletes
AIN-93DCp	Dieta AIN 93 deficiente em colina na forma de pó
AIN-93DCpel	Dieta AIN 93 deficiente em colina na forma de peletes
AIN-93Pp	Dieta AIN 93 na forma de pó
AIN-93Ppel	Dieta AIN 93 na forma de peletes
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AR	Aldolase reductase
Arg	Arginina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BHMT	Betaína homocisteína metiltransferase
C-1	Carbono anomérico do açúcar
CAT	Catalase

CBS	Cistationa-B-sintetase
CD-36	Cluster de diferenciação 36
CEHS	Células endoteliais hepáticas sinusoidais
CHE	Células hepáticas estreladas
ChREBP	Proteína ligadora do elemento regulador de carboidratos
CK	Células de <i>Kupffer</i>
CML	Carboximetilisina
Cont	Controle
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DA	Doença de <i>Alzheimer</i>
DAG	Diacilglicerol
DC	Dieta deficiente em colina
DCAF	Dieta de cafeteria
DCM	Dietas deficientes em colina e metionina
DCV	Doença cardiovascular
DFGNA	Doença do fígado gorduroso não alcoólica
DG	Desoxiglicosonas
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DRC	Dieta rica em carboidrato
DRCR	Doença renal crônica
DRG	Dieta rica em gordura
DTNB	Ácido 5,5'-bisditionitro-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EH	Esteatose hepática
EHNA	Esteato hepatite não alcoólica
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
FANUT	Faculdade de Nutrição
FAS	Ácido graxo sintase

GLUT 2	Transportador de glicose 2
GLUT 4	Transportador de glicose 4
GLUT 5	Transportador de glicose 5
GO	Glioxal
GPJ	Glicemia plasmática de jejum
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSR	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona oxidase
H•	Hidrogênio radicalar
HbA1	Hemoglobina glicada
HDLc	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
I κ k β	Inibidor do fator nuclear kappa β quinase
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPGs	Intermediários de produtos de glicação
IRS	Subestrato receptor de insulina
IRS-1	Substrato receptor de insulina 1
L•	Radical lipídico
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade
LDN	Lipogênese de novo
LPL	Lipoproteína lipase
LXRs	Receptor X hepático
Lys	Lisina
MAT	Metionina adenosiltransferase
MDA	Malondialdeído
mDia1	<i>Diaphanous 1</i>
MGO	Metilglioxal
MPO	Myeloperoxidase
MS	Metionina sintase
N5-metilTHF	<i>N</i> ₅ -metiltetraidrofolato

NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NF- κ β	Fator nuclear kappa β
NOs	Óxido nítrico sintetase
Nrf-1	Fator nuclear respiratório 1
NT	Neutrófilos
OGTT	Teste oral de tolerância à glicose
PAF	Peso absoluto do fígado
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio 1
PBS	Tampão fosfato salina
PCF	Peso corporal final
PCR	Proteína C reativa
PEMT	Fosfatidiletanolamina-N-metiltransferase
PKC	Proteína quinase C
PL	Peroxidação lipídica
PLP	Piridoxal-5-fosfato
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PRF	Peso relativo do fígado
Prx	Peroxirredoxinas
P3q	Fosfatidilinositol 3 quinase
RAGE	Receptor de AGEs
RAGEs	RAGE secretor
sRAGE	RAGE solúvel
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SAH hidrolase	S-adenosil homocisteína hidrolase
SAMe	S-adenosilmetionina
SCD-1	Estearoil coenzima A dessaturase-1
ScR-II	Receptor scavenger classe A do tipo II
SDH	Sorbitol desidrogenase
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida/ dodecil sulfato de sódio

SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SP-1	Proteína de especificidade 1
sRAGE	RAGE solúvel
SREBP-1c	Proteína ligadora do elemento regulador de esterol
TAG	Triacilglicerois
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Tampão tris salina e Tween 20
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetraidrofurano
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Trx1	Tioredoxina 1
Trx2	Tioredoxina 2
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VLDLc	Lipoproteína de muito baixa densidade
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO ALCOÓLICA (DFGNA): PAPEL DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E DO ESTRESSE OXIDATIVO NA FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA	28
2.2	PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs): FORMAÇÃO E EFEITOS.....	39
2.3	RECEPTORES DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) E AUMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA HEPÁTICA	49
2.4	O PAPEL DOS EROS E AGEs NA EVOLUÇÃO DA DFGNA	56
2.5	MODELOS ANIMAIS DA DFGNA.....	64
2.6	DIETAS DEFICIENTES EM FATORES LIPOTRÓFICOS	71
3	OBJETIVOS	77
3.1	OBJETIVO GERAL	77
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
4	EXPERIMENTAL.....	78
4.1	MATERIAIS	78
4.1.1	REAGENTES	78
4.1.2	EQUIPAMENTOS	78
4.2	MÉTODOS.....	79
4.2.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO, TRATAMENTO DIETÉTICO E PREPARAÇÃO DAS DIETAS	79
4.2.2	MANEJO E SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	83
4.2.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	83
4.2.4	PREPARO DA AMOSTRA DO TECIDO HEPÁTICO	85
4.2.5	DOSAGEM DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE LOWRY	86
4.2.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO	86
4.2.7	ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL REDOX HEPÁTICO	87
4.2.7.1	TIOIS REDUZIDOS TOTAIS	87
4.2.7.2	ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	87
4.2.7.3	PROTEÍNAS CARBONILADAS.....	88
4.2.7.4	CATALASE.....	89
4.2.7.5	SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	90
4.2.8	ANÁLISE DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA RAGE, IL 1 BETA, TNF-ALFA NO TECIDO HEPÁTICO	91
4.2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
5.1	HISTOLOGIA HEPÁTICA	92

5.2	PESO DOS ANIMAIS E INGESTÃO DIETÉTICA.....	98
5.3	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	102
5.4	PERFIL REDOX HEPÁTICO.....	107
5.5	<i>WESTERN BLOT</i> PARA RAGE, IL-1 _{BETA} E TNF-ALFA	116
	CONCLUSÃO	128
	PERSPECTIVAS.....	129
	REFERÊNCIAS.....	130

1 INTRODUÇÃO

O fígado tem um papel central em vários processos metabólicos incluindo metabolismo de carboidratos e lipídios, síntese de proteínas plasmáticas, produção de hormônios e desintoxicação de substâncias deletérias. Este órgão é o único capaz de sofrer hiperplasia compensatória após a perda celular. Os hepatócitos executam a maioria das funções, enquanto células endoteliais hepáticas sinusoidais (CEHS), células de *Kupffer* (CK) e células hepáticas estreladas (CHE) desempenham funções diferentes. CEHS regulam a difusão entre o sangue e a superfície dos hepatócitos, CK são macrófagos responsáveis por secretar potentes mediadores da resposta inflamatória precoce, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e CHE estocam vitamina A, controlam o *turnover* da matriz extracelular e regulam a contratilidade de sinusóides (BASTA et al., 2011).

Por apresentar um potente sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático) as células hepáticas, especialmente os hepatócitos, tem uma capacidade substancial para metabolizar e eficazmente desintoxicar EROs, reparando danos oxidativos. No entanto, na presença de injúria hepática estas funções apresentam-se prejudicadas, podendo ocasionar morte celular (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2011).

A esteatose hepática (EH) é um problema clínico crescente em todo o mundo. Possui o estresse oxidativo (EO) hepático ligado à sua evolução clínica. EH está associada à obesidade, à resistência à insulina (RI) (sensibilidade celular reduzida à ação da insulina), ao diabetes mellitus (DM) e à síndrome metabólica (SM), sendo uma das alterações que caracterizam a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA). DFGNA é histologicamente classificada em EH e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). EH é caracterizada pela presença do acúmulo de gordura hepática sem qualquer evidência de injúria hepatocelular na forma de hepatócitos balonizados, enquanto EHNA, pela presença de EH e inflamação com lesão hepatocelular (hepatócitos balonizados), com ou sem fibrose (CHALASANI et al., 2012; ANSTEE; GOLDIN, 2006; BROWNING; HORTON, 2004). O desenvolvimento da DFGNA, em seres humanos e ratos obesos, principalmente, é um resultado da interação entre fatores genéticos, ambientais (dieta em particular) e

da microbiota intestinal, representando uma doença complexa com variação considerável em termos de gravidade entre os indivíduos (RAY, 2013).

Mudanças drásticas no estilo de vida e dieta da população mundial estão direcionando a uma epidemia mundial de obesidade e aumento da prevalência da DFGNA. É importante ressaltar que a DFGNA poderá substituir a hepatite viral como principal causa de doença hepática em estágio terminal e transplante hepático ao longo da próxima década, afetando crianças e adultos (RAY, 2013)

Na evolução da DFGNA, o EO, a partir da peroxidação lipídica (PL), é responsável pela formação de compostos envolvidos com o processo inflamatório, EHNA e sua perpetuação. Como exemplo, tem-se a presença de dienos conjugados, malondialdeído (MDA) e produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*), em análises de extratos hepáticos de fígados esteatóticos (LORENZI et al., 2011; MARCOLIN et al., 2011). Os AGEs são um grupo heterogêneo de moléculas produzidas por glicação e oxidação *in vivo*. A glicação é a principal causa de danos espontâneos a proteínas celulares e extracelulares em sistemas fisiológicos com sua formação ocorrendo lentamente sob condições normais (SOUZA et al., 2012; KIMURA et al., 2010).

Na resistência insulínica, com hiperglicemia e PL, a geração de AGEs aumenta consideravelmente, contribuindo para o desenvolvimento de doenças crônicas, tais como aterosclerose, doença de *Alzheimer*, insuficiência renal e doenças gastrointestinais, tais como esteatose e cirrose hepática (SOUZA et al., 2012; KIMURA et al., 2010; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; BROWNING; HORTON, 2004). AGEs modificam propriedades químicas e biológicas de diversas proteínas (ou aminoácidos) por ligação cruzada com estas moléculas ou por interação com proteínas da matriz e receptores especializados, tais como os receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (ASSIS, 2009; VLASSARA; PALACE, 2002).

A depender do tipo de célula e das condições experimentais, a interação AGEs/RAGE em hepatócitos e células estreladas hepáticas leva a um aumento da produção de EROs através da ativação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPHox). Isso aumenta a proliferação e ativação celular destas

células, desempenhando assim um papel importante na progressão da fibrose hepática na EHNA (GAENS et al., 2012; VLASSARA; PALACE, 2002).

O EO pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre fatores que geram EROs e aqueles que protegem a célula (o sistema antioxidante) (VLASSARA; PALACE, 2002), levando a alterações estruturais de biomoléculas (DNA, carboidratos, proteínas e lipídios), perda da sinalização celular e controle da expressão gênica, apoptose ou necrose (PATEL et al., 2012; BUSCH et al., 2010).

Os sistemas antioxidantes presentes no sangue humano ou outros fluidos biológicos são divididos em enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutational- peroxidase e redutase) e não enzimáticos (glutational e outros tióis, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, transferrina e ceruloplasmina, entre outros) (PATEL et al., 2012; EDEAS et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

No EO, o sistema antioxidante não é suficiente e modificações químicas em biomoléculas essenciais, devido ao ataque de EROs, são a causa principal para a inativação funcional destas moléculas ou para a morte celular programada, apoptose, ou mesmo para uma resposta celular adaptativa com a ativação de fatores de transcrição redox sensíveis, como, por exemplo, NF- κ B (fator nuclear kappa B), Nrf-1 (fator nuclear respiratório 1) e SP-1 (proteína de especificidade 1), que contribuem para a produção de mediadores pró-inflamatórios e fibrogênicos, intercedida por CK e CHE (DE M BANDEIRA et al., 2013).

Na EHNA, uma maior expressão da citocromo P450 2E1 (CYP2E1) resulta em aumento significativo nos níveis de EROs, com subsequente PL e formação de MDA e 4-hidroxinonenal. Além da CYP2E1, o EO no retículo endoplasmático e estágios da sinalização inflamatória redox-sensíveis também estão associados com a progressão da doença. DFGNA emerge como a principal causa de doença hepática crônica em associação com o aumento da prevalência da obesidade e do diabetes tipo 2 na população. EO e RI são os maiores contribuintes para a patogênese da DFGNA e para a progressão da esteatose a esteato-hepatite (STYSKAL et al., 2012; MALAGUARNERA et al., 2009).

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese da EH e EHNA. A utilização de modelos animais permite melhor entendimento de sua fisiopatologia e de sua evolução para as fases mais avançadas da doença. Além disso, possibilita o estudo dos mecanismos de ação de vários fármacos e dietoterapias disponíveis para o auxílio de seu tratamento. No entanto, deve-se lembrar que modelos animais não são humanos e existem grandes diferenças entre as espécies em relação a reação imune, expressão gênica/ regulamentação metabólica, respostas farmacológicas ou teciduais (STARKEL; LECLERCQ, 2011).

Neste contexto, a utilização de dietas que promovam o desenvolvimento de DFGNA, seja por serem ricas em gordura ou carboidrato, seja pela restrição de aminoácidos lipotróficos, tem sido feita pela comunidade científica (ZAMIN et al., 2009). Dietas deficientes em colina e metionina (DCM) são um modelo de experimentação animal que pode auxiliar na elucidação de mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DFGNA. Na situação de deficiência destes componentes dietéticos, a esteatose é resultado da secreção hepática prejudicada de triacilgliceróis, devido à formação defeituosa de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Além disso, a β -oxidação de lipídios fica reduzida, contribuindo para a ocorrência do acúmulo de lipídios no fígado (ZAMIN et al., 2009; KOTEISH; DIEHL, 2002).

No presente estudo com ratos *Wistar*, a manipulação dietética para indução do quadro de DFGNA foi realizada através da retirada de colina ou de colina+ cistina da dieta, reconhecidos fatores lipotróficos envolvidos com a formação da fosfatidilcolina, fosfolípido constituinte das partículas de VLDL. Colina e cistina foram os aminoácidos de escolha por serem os de adição na dieta utilizada (composição dietética do Instituto Americano de Nutrição na versão 93). A fonte principal de proteína, a caseína, não foi alterada, pois em versão dietética anterior (AIN-76), foi visto que uma concentração menor dos aminoácidos de adição presentes nesta dieta era suficiente para induzir o quadro de esteatose (REEVES 1997). Os presentes modelos foram criados com o intuito de investigar, em fases diferentes da doença hepática, a relação com o estresse oxidativo. Além disso, como o trabalho também visava obter evidências do envolvimento de AGEs e RAGE

no agravamento da doença e sua relação com o EO, parte destas dietas foi aquecida, para uma melhor avaliação do efeito da oferta dietética de AGEs no desenvolvimento/ evolução da patologia. É reconhecido pela comunidade científica que o tratamento térmico aumenta a quantidade de AGEs nos alimentos (KIMURA et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Por se tratar a DFGNA de uma doença de prevalência mundial crescente, o estudo do envolvimento dos AGEs/RAGEs e do estresse oxidativo com o dano hepático é tema de forte interesse na comunidade científica. Em vista disto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de dietas deficientes em fatores lipotróficos, no dano hepatocelular, em modelos animais, a partir do monitoramento do estresse oxidativo, via mensuração de alguns marcadores (proteínas carboniladas, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, tióis totais e atividade das enzimas SOD e catalase), de processos inflamatórios (TNF-alfa e interleucina-I beta) e da expressão de RAGE. Visa, com isto, fornecer subsídios para apoiar os mecanismos moleculares básicos da geração de AGEs e do EO e sua influência, de forma independente ou em conjunto, na evolução da doença hepática. Em um futuro próximo, poderão ser concebidas intervenções terapêuticas racionais para esta doença, melhorando a expectativa e qualidade de vida dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA): papel dos produtos de glicação avançada e do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença

No tecido hepático normal, o conteúdo celular de triglicilgliceróis (TAG) é regulado, *in loco*, pela atividade integrada de diversas moléculas. A síntese e a esterificação dos ácidos graxos livres (AGL) são chamadas de *input*, e a oxidação dos ácidos graxos e a exportação de TAG hepático, através de VLDL, de *output*. A esteatose hepática (EH) ocorre quando o *input* excede a capacidade de *output* (EDEAS et al., 2010; ANSTEE; GOLDIN, 2006; BROWNING; HORTON, 2004) e está associada com abuso de álcool, obesidade, suporte nutricional excessivo, nutrição parenteral total, hepatite induzida por drogas ou toxinas, diabetes mellitus (DM) tipo 2 e pós-operatório de pacientes submetidos à derivação jejuno-ileal (MARRA et al., 2008).

Além disso, outro fator que vem contribuindo para o desenvolvimento da doença é a supressão da autofagia na DFGNA. A autofagia hepática (processo pelo qual proteínas e organelas intracelulares são degradadas nos lisossomos) contribui para a manutenção do balanço energético, participa na integridade dos hepatócitos, auxilia na defesa contra patógenos endógenos e contra condições que causam toxicidade celular ao fígado. A falha da autofagia na EH poderia ser uma causa subjacente ao acúmulo de lipídios neste órgão ou uma consequência. Embora a autofagia desempenhe um papel ativo na mobilização de lipídios intracelulares, um aumento anormal no teor de lipídios, principalmente de ácidos graxos saturados, pode exercer um efeito inibidor sobre a autofagia (SCHNEIDER; CUERVO, 2013).

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

morfológica da esteatose são diferentes. No primeiro caso, o mecanismo básico está relacionado ao aumento do fluxo de AGL para o fígado e à redução da mobilização de gorduras a partir dele. No segundo, ocorre a diminuição da β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, gerando um distúrbio maior no metabolismo oxidativo da célula. Neste caso, expressão da forma aguda da esteatose, o prognóstico é mais grave, podendo levar à insuficiência hepática e ao óbito (Figura 1, Tabela 1) (GAYOTTO et al., 2001).

Aproximadamente 3% dos casos de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) progridem para estágios mais avançados da DFGNA como fibrose, cirrose, carcinoma hepatocelular e necrose (Figura 1). A EH até recentemente foi considerada como uma condição benigna em que apenas exercícios físicos e perda de peso poderiam contribuir para a reversão da doença. No entanto, atualmente, há um consenso de que a acumulação de gordura no fígado sensibiliza o órgão ao desenvolvimento de outros tipos de doenças crônicas (CHALASANI et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2007).

A prevalência mundial estimada da DFGNA, baseada em diversos métodos de avaliação, varia de 6,3 a 33% da população, com uma média de 20%. Os principais fatores de risco para a doença são obesidade, DM tipo 2 e dislipidemia (CHALASANI et al., 2012). A DFGNA tipicamente ocorre em pacientes sem história de consumo significativo de álcool e está intimamente associada com obesidade abdominal, dislipidemia aterogênica, hipertensão, resistência à insulina (RI) e intolerância à glicose e a fatores de risco cardiovascular, todos componentes da síndrome metabólica (SM) (Figura 2, Tabela 1) (ZHOU et al., 2008). Para a EHNA, baixos valores de prevalência são observadas, variando de 3 a 5%. Não há dados disponíveis para cirrose causada por EHNA. Mais estudos são necessários para compreender a incidência de EH em diferentes idades, grupos étnicos e geográficos (CHALASANI et al., 2012).

Figura 1 - Componentes da DFGNA e mecanismos de evolução. A DFGNA é composta por EH, EHNA e cirrose, sendo fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepático. A primeira etapa é composta pela esteatose ou acúmulo de gordura no fígado; a segunda etapa pela inflamação da EHNA e a terceira pela morte do hepatócito. Alterações histológicas: (1) EH: esteatose hepática, acúmulo de gordura na célula hepática, sem evidência de injúria hepatocelular ou fibrose; (2) EHNA: presença de esteatose hepática, infiltrado inflamatório e hepatócitos balonizados, com ou sem fibrose; (3) Cirrose: caracterizada por fibrose extensa, desorganização da arquitetura lobular e vascular e presença de nódulos de hepatócitos em regeneração. A DFGNA é fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepático (4). DFGNA, doença do fígado gorduroso não alcoólica; EH, esteatose hepática; EHNA, esteato hepatite não alcoólica; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; AGEs, produtos finais de glicação avançada, do inglês *advanced glycation end products*; RAGE, receptores de AGEs; $I\kappa\kappa\beta$, inibidor do fator nuclear kappa β quinase; $NF\kappa\beta$, fator nuclear kappa β ; $TNF-\alpha$, fator de necrose tumoral alfa; IL-6, interleucina 6; RE, retículo endoplasmático

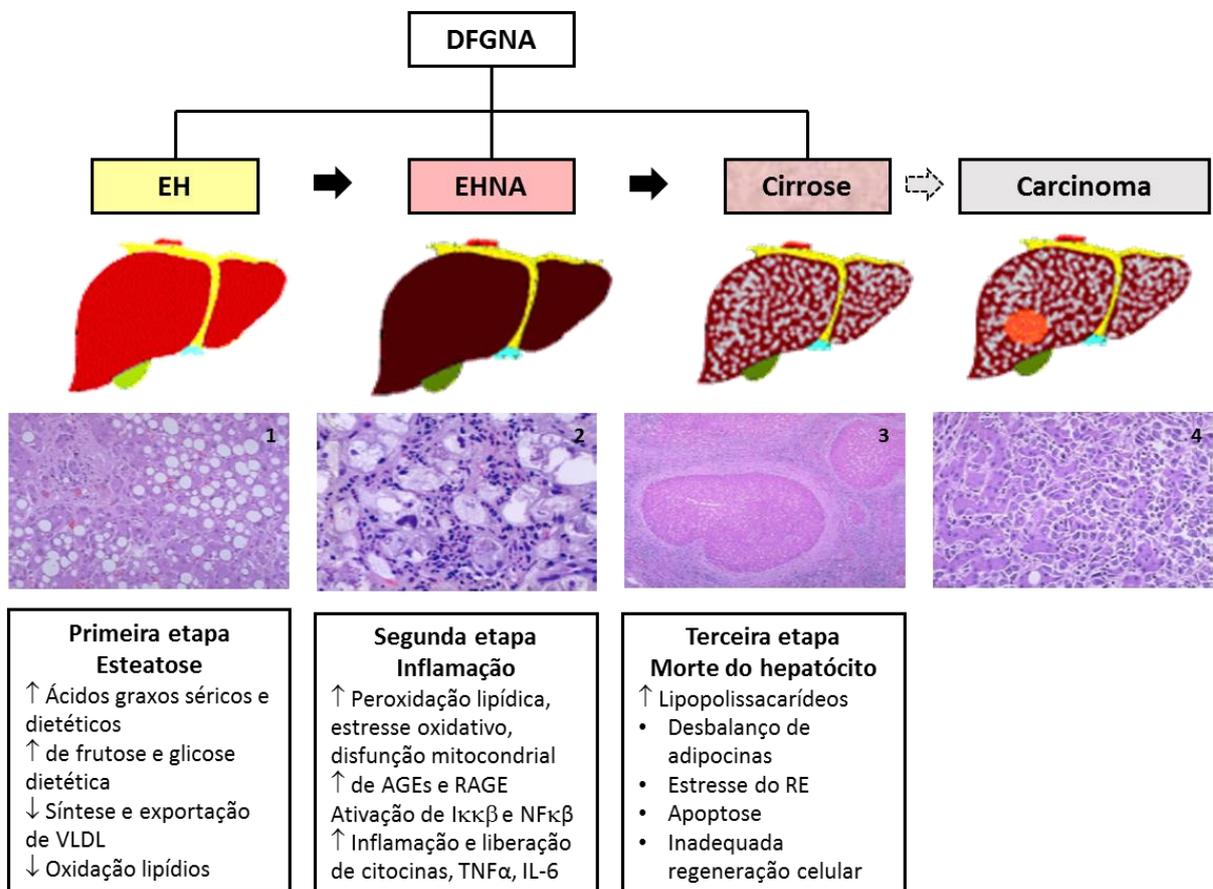


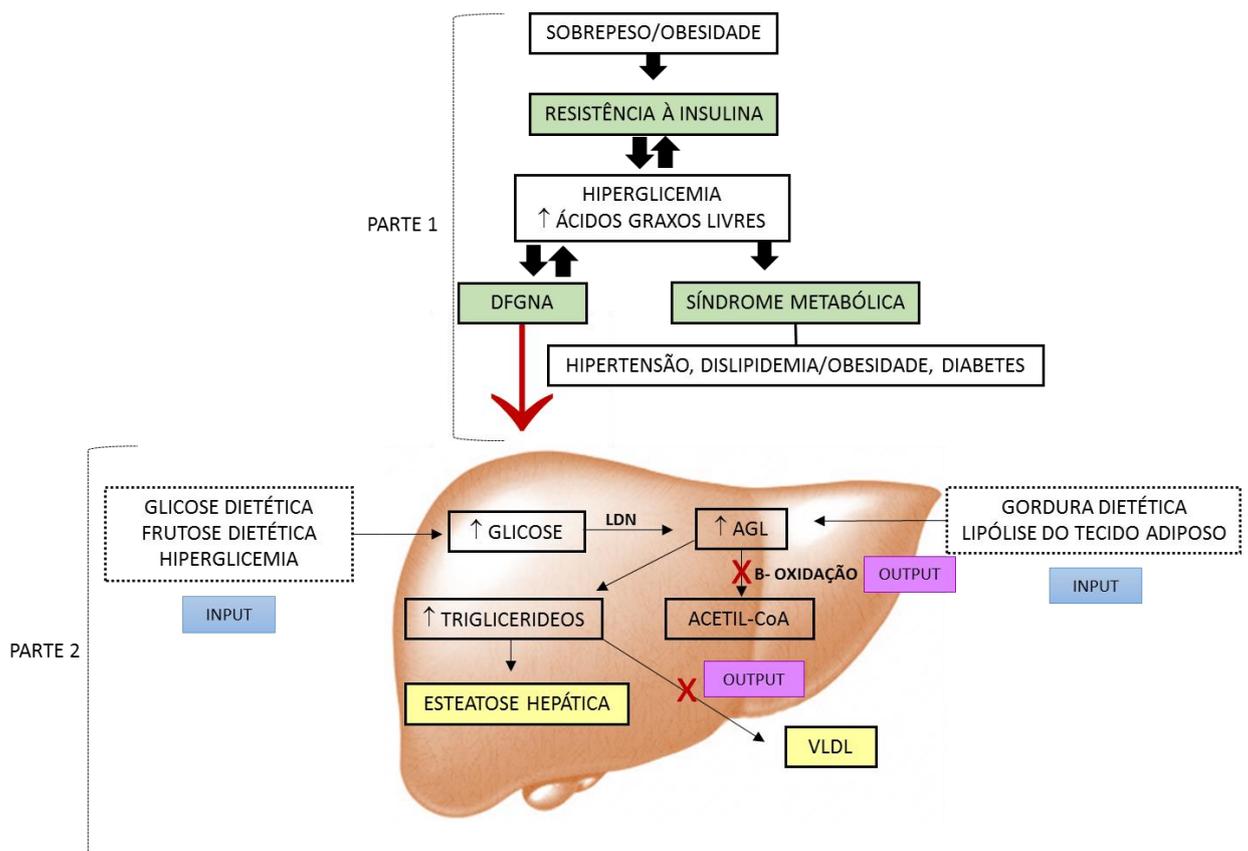
Tabela 1 - Descrição e critérios diagnósticos de doenças relacionadas à doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA)

Doença	Descrição	Diagnóstico	Ref
Síndrome Metabólica (SM)	Desordem complexa representada por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, usualmente relatado por deposição de gordura central e resistência à insulina	Obesidade abdominal, definida pelo aumento da circunferência da cintura (≥ 90 cm em homens e ≥ 80 cm em mulheres) e duas ou mais das seguintes características: pressão sanguínea ($\geq 130/85$ mm/Hg), altos níveis de glicemia de jejum (≥ 100 mg/dL), triglicerídeos (≥ 150 mg/dL) ou níveis de HDL colesterol (< 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres)	IDF, 2012
Diabetes	Grupo heterogêneo de desordens metabólicas que tem em comum a hiperglicemia, o qual é um defeito na ação da insulina, secreção da insulina ou ambos	Critérios da <i>World Health Organization</i> : glicemia plasmática de jejum (GPJ) ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL) ou teste oral de tolerância à glicose 75g (OGTT) com GPJ ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dL) e/ou 2 h glicose plasmática ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL) ou, hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6.5\%$ /48 mmol/mol, ou glicose randômica no plasma ≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL) na presença de sintomas clássicos de diabetes	IDF, 2012; VLASSARA; GARY, 2010
Doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA)	Engloba o espectro completo de doença do fígado gorduroso em indivíduos sem consumo significativo de álcool, indo desde o fígado gorduroso até esteato-hepatite e cirrose	(a) presença de esteatose hepática por imagem ou histologia, (b) consumo de álcool não significativo, (c) outras etiologias para esteatose hepática descartadas, (d) não co-existência de outras causas para doença hepática crônica	CHALASANI, et al., 2012; PADOIN, et al., 2008; VLASSARA; PALACE, 2002;
Esteatose hepática (EH)	Presença de esteatose hepática sem evidência de injúria hepatocelular na forma de hepatócitos balonizados ou fibrose	Biópsia hepática com análise histológica	CHALASANI, et al., 2012
Esteatohepatite não alcoólica (EHNA)	Presença de esteatose hepática e inflamação com injúria hepatocelular (hepatócitos balonizados) com ou sem fibrose	Biópsia hepática com análise histológica	CHALASANI, et al., 2012
Cirrose hepática	DFGNA Score de Fibrose*		CHALASANI, et al., 2012

* Ferramentas clinicamente úteis para identificar pacientes com DFGNA com maior predisposição para ter fibrose ou cirrose. O score de fibrose DFGNA é baseado em 6 variáveis facilmente mensuráveis e calculado usando fórmulas publicadas (<http://nafldscore.com/> NAFLD fibrosis score: $-1.675 + 0.037 \times \text{age (years)} + 0.094 \times \text{BMI (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{IFG/diabetes (yes = 1, no = 0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT ratio} - 0.013 \times \text{platelet (x10}^9\text{/l)} - 0.66 \times \text{albumin (g/dl)}$) (CHALASANI et al., 2012).

A DFGNA não é um componente de diagnóstico da SM, no entanto, tal como outras doenças que fazem parte da síndrome, tem a RI associada ao seu desenvolvimento. Uma importante observação mostrada por estudos científicos é que a prevalência da DFGNA está aumentando junto com sobrepeso-obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão, todos componentes da SM. A DFGNA está aumentada em indivíduos com intolerância à glicose (43%) e naqueles recentemente diagnosticados com DM (62%). No entanto, indivíduos magros, com tolerância normal à glicose, também podem desenvolver a doença. O aumento das prevalências de DFGNA e SM emergem como importantes problemas de saúde pública (PACIFICO et al., 2011; VANNI et al., 2010; PADOIN et al., 2008; ZHOU et al., 2008).

Figura 2 - Desenvolvimento da esteatose hepática e sua associação com a SM. 1: Excesso de peso/obesidade leva à RI nos tecidos extra-hepáticos, resultando em hiperglicemia e aumento do influxo de AGL para o sangue, fatores comuns no desenvolvimento de componentes-chave da SM (hipertensão, obesidade, dislipidemia, diabetes tipo 2). A DFGNA também aumenta os níveis de glicose e da liberação de AGL para o sangue, contribuindo para a manutenção da RI; **2: Input-** excesso dietético de glicose/frutose e hiperglicemia, aumentam a síntese de lipídios via LDN e o aumento da gordura dietética e lipólise do tecido adiposo exacerbam a RI, aumentando a lipogênese. **Output-** corresponde a uma disfunção mitocondrial oxidativa e prejuízo da formação de VLDL. Na EH os processos apresentam disfunção. DFGNA: doença do fígado gorduroso não alcoólica; *Input*: entrada ; AGL: ácidos graxos livres; RI: resistência à insulina; SM: síndrome metabólica; LDN: lipogênese de novo ; *Output*: saída; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.



Resultados de estudos a longo prazo em pacientes com EH e EHNA demonstraram que pacientes com DFGNA apresentam mortalidade maior que populações controle correspondentes. A causa mais comum de morte em pacientes com DFGNA são as doenças cardiovasculares, já que compartilham fatores de risco comuns. Pacientes com EHNA (e não com EH) apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada em função de injúria hepática (CHALASANI et al., 2012).

Os pacientes com EH frequentemente descobrem a DFGNA por acaso, através de exames de imagem para investigação de outras doenças. A suspeita de DFGNA geralmente está associada com níveis elevados dos marcadores de lesão hepática (AST, aspartato aminotransferase, e ALT, alanina aminotransferase), na ausência de consumo de álcool e exclusão de outras causas de doença hepática crônica. No entanto, estes marcadores de injúria podem apresentar níveis normais. Por ser uma doença de evolução lenta, as queixas dos pacientes são inespecíficas e ocorrem principalmente com o agravamento da lesão. Entre as manifestações clínicas mais comuns incluem-se fraqueza, fadiga, mal-estar e dor vaga no quadrante superior direito do abdômen. Hepatomegalia pode estar presente, no entanto, esplenomegalia, varizes, ascite e circulação colateral são sinais clínicos associados com a cirrose (CHALASANI et al., 2012; MARRA et al., 2008; ZHOU et al., 2008).

O tratamento de pacientes com DFGNA consiste nos cuidados gerais com as doenças hepáticas junto a co-morbidades metabólicas associadas, como obesidade, dislipidemia, RI e diabetes tipo 2. Pacientes com EH têm excelente prognóstico com a mudança no estilo de vida. Intervenções orientadas para a perda de peso têm demonstrado melhora na tolerância à glicose, fatores de risco para a SM, transaminases e histologia hepática. A perda de pelo menos 3-5% do peso corporal parece ser necessária para melhorar a esteatose, mas uma perda de peso maior (até 10%) pode ser necessária para melhorar a necroinflamação. Para a EHNA, o melhor tratamento parece ser a prevenção. Devido ao papel do estresse oxidativo (EO) no desenvolvimento e na progressão da DFGNA, muitos estudos têm utilizado antioxidantes como terapia, com resultados promissores. A vitamina E se destaca como o antioxidante com melhores resultados no tratamento da doença. Administrada numa dose diária de 800 UI/dia (α -tocoferol) melhora a histologia

hepática em adultos não diabéticos com EHNA comprovada por biópsia e, portanto, deve ser considerada como uma farmacoterapia de primeira linha para esta população de pacientes. Outros compostos permanecem em estudo para o tratamento da EHNA (CHALASANI et al., 2012; ZHOU et al., 2008).

A maioria dos indivíduos com esteatose são assintomáticos. Entretanto, as características mais comuns envolvendo os marcadores de danos hepáticos são o aumento de duas a três vezes dos níveis séricos de ALT (citoplasmática) e AST (citoplasmática e mitocondrial) através de lise celular que ocorre juntamente com o dano hepático. A razão de AST/ALT é tipicamente menor que um. Quando se torna maior que um, a progressão da doença está presente com lise celular e mitocondrial. Doenças hepáticas com $AST/ALT < 1$ são muitas vezes relacionadas com a obesidade, falta de exercício e hiperlipidemia, enquanto $AST/ALT > 1$ está relacionada com o consumo de álcool e diabetes tipo 2. Altos níveis de ALT em DFGNA sugerem o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (SEO et al., 2012; SCHEEN; LUYCKX, 2002).

Dados publicados no "*Third National Health and Nutrition Survey*" refletem uma associação significativa entre a alta concentração de ALT e RI, diabetes tipo 2 e SM (UTZSCHNEIDER; KAHN, 2006). Os mecanismos de ação da insulina no fígado são diferentes daqueles em tecido adiposo e no músculo esquelético: nos últimos tecidos, RI é uma doença genética ou adquirida em que concentrações fisiológicas do hormônio não sustentam uma resposta normal de captação da glicose pelas células. Menor absorção de glicose aumenta a produção de insulina pancreática para manter os níveis de glicose normais, portanto, a hiperinsulinemia é frequente na RI. No tecido hepático, a RI pode ser definida como uma falha do hormônio para suprimir adequadamente a produção de glicose hepática. No entanto, a atividade lipogênica da insulina parece não ser prejudicada na RI (LIANGPUNSAKUL; CHALASANI, 2005).

Na RI, a atividade da lipase hormônio-sensível é mantida (Figura 2) em tecidos periféricos, aumentando o fornecimento de AGL para o plasma e subsequentemente para o fígado, o "amortecedor sistêmico do organismo". O aumento intracelular das concentrações de acil-CoA e diacilglicerol (DAG) nos tecidos extra-hepáticos está associado com maiores níveis de TAG e AGL, em

adição ao decréscimo de etapas da sinalização do receptor de insulina, o qual pode em parte induzir RI (ANSTEE; GOLDIN, 2006; SOLÍS HERRUZO et al., 2006).

Elevados níveis de AGL circulantes estão associados a uma menor fosforilação em sítios específicos e a uma menor ativação de proteínas-chave da via da insulina (substrato receptor de insulina (IRS)/ fosfatidilinositol 3-quinase I (P3q)). AGL e derivados deste (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas), como mencionado anteriormente, possuem relação direta com a resistência à insulina. O aumento desses compostos é capaz de provocar a ativação da PKC e/ou da kinase I κ B, e também de causar fosforilação em serina do receptor de insulina e de seus substratos. Como consequência, a fosforilação do IRS-1 é inibida, levando a uma menor ligação de fosfatidilinositol-3-quinase para o IRS-1 e menor translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana, estimulada pela insulina, com subsequente agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia (SOUZA et al., 2012; PAULI et al. 2009; ANSTEE; GOLDIN, 2006; SOLÍS HERRUZO et al., 2006).

Alguns mecanismos da DFGNA estão sob investigação, entretanto, o acúmulo de TAG em hepatócitos como um resultado da RI é considerado a primeira etapa para o modelo patogênico atual, amplamente aceito. O EO resultante da oxidação mitocondrial de ácidos graxos e da expressão de citocinas inflamatórias é considerado um fator causal secundário a danos no fígado, fibrose e inflamação (EDEAS et al., 2010; LECLERCQ et al., 2007; SOLÍS HERRUZO et al., 2006).

No fígado, a ação de vários fatores de transcrição relacionados com os efeitos lipogênicos e antilipolíticos da insulina, incluindo, PPAR- γ (receptor ativado por proliferador de peroxissomo), fatores de transcrição SREBP-1c (proteína ligadora do elemento regulador do estero) e ChREBP (proteína ligadora do elemento regulador de carboidratos) permanecem inalterados mesmo em estados de RI (LIANGPUNSAKUL; CHALASANI, 2005), contribuindo para o acúmulo de gordura no tecido hepático. A ativação de receptores nucleares, incluindo os LXRs (receptor X hepático), ambos LXR α e β , tem mostrado promover a lipogênese por ativação da SREBP-1c e dos seus genes-alvo. Em adição a etapas LXR-SREBP, um acúmulo de evidências tem sugerindo que LXRs têm alvos de transcrição adicionais, tais como PPAR- γ , ChREBP, SCD-1 (estearoil-CoA dessaturase-1) e LPL

(lipoproteína lipase), os quais também contribuem para um efeito lipogênico (STYSKAL et al., 2012).

Acredita-se que a esteatose sensibiliza o fígado a insultos secundários durante o desenvolvimento da inflamação hepática e outras complicações. O mecanismo exato da progressão da EH a EHNA é desconhecido. A hipótese mais aceita é a de Day e James (1998), que divide o processo fisiopatológico em duas etapas. A primeira etapa consiste no mecanismo que provoca a EH, isto é, o aparecimento inicial do processo. Portanto, a RI, que resulta em hiperinsulinemia e favorece a lipólise no tecido adiposo, aumenta excessivamente o fornecimento de AGL para o fígado e pode resultar em EH. A primeira etapa, então, deixa os hepatócitos mais vulneráveis à segunda etapa, que pode ser iniciada por vírus, álcool, lipopolissacarídeos, entre outros, promovendo EO hepático e conduzindo à EHNA, cirrose e carcinoma hepatocelular (YAMAGUCHI et al., 2007).

Outro modelo sugerido por Wanless; Shiota (2004) propõe quatro fases para a progressão da EH a danos teciduais mais severos. As duas primeiras etapas compreendem as fases anteriormente descritas, já a terceira etapa é caracterizada pelo vazamento de lipídios para o interstício do fígado, levando a danos diretos e inflamação das veias hepáticas. A quarta etapa é caracterizada por obstrução venosa com o colapso secundário, fibrose e cirrose, (LIANGPUNSAKUL; CHALASANI, 2005; BROWNING; HORTON, 2004). A esteatose pode induzir uma resposta inflamatória de baixo grau, semelhante à inflamação do tecido adiposo resultante do acúmulo de lipídios nos adipócitos. Além disso, em indivíduos obesos, a inflamação hepática e fibrose pode resultar da exposição do fígado gordo a mediadores metabólicos e pró-inflamatórios, produzidos pela gordura visceral e drenado para a circulação portal (SOLÍS HERRUZO et al., 2006).

O aumento da oferta de ácidos graxos para os hepatócitos aumenta a beta-oxidação mitocondrial e os níveis de citocromos P450 e P450 2E1 (CYP2E1), conduzindo ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). EO tem um papel importante na transição da EH para EHNA, embora o exato mecanismo molecular da EHNA não esteja ainda elucidado. O acúmulo de lipídios no fígado com esteatose está associado com a peroxidação lipídica, análoga a observada em lipoproteínas de baixa densidade em lesões ateroscleróticas (KUMAR

et al., 2013; GAENS et al., 2012; SOUZA et al., 2012). Assim, na EHNA, a crescente oferta de AGL para o fígado aumenta a geração de EROs como resultado da transferência de elétrons em reações produtoras de energia. Além disso, a interação de AGEs/RAGE (tópico a seguir) pode posteriormente alterar a expressão de genes em vários tipos de células incluindo hepatócitos e células estreladas hepáticas. O aumento na proliferação e a ativação das células estreladas hepáticas participa da progressão da fibrose hepática em EHNA (KUMAR et al., 2013; GAENS et al., 2012; SOUZA et al., 2012; VLASSARA; HYOGO et al., 2007; PALACE, 2002).

2.2 Produtos de glicação avançada (AGEs): formação e efeitos

Os AGEs são formados a partir de interações não-enzimáticas amino-carbonila. Nestas reações, os açúcares redutores ou lipídios oxidados reagem com as proteínas, aminoácidos, aminofosfolipídios ou ácidos nucleicos (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009). A formação de AGEs pode ocorrer em alimentos submetidos a altas temperaturas, tais como frituras e grelhados e em sistemas biológicos, como nos seres humanos (URIBARRI et al., 2010).

A presença de AGEs é comum no processo de envelhecimento, no entanto, o acúmulo é maior, e portanto anormal, em altas concentrações de glicose. O dano micro e macrovascular, observado no diabetes, é atribuído à deposição de AGEs em tecidos, também associado com a aterosclerose, a doença de *Alzheimer*, doença renal em fase terminal, a artrite reumatóide, sarcopenia, cataratas e outras doenças oftálmicas degenerativas, doença de *Parkinson*, demência vascular e de várias outras doenças crônicas, entre elas as gastrointestinais (Tabela 2) (SANTOS et al., 2013; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010;).

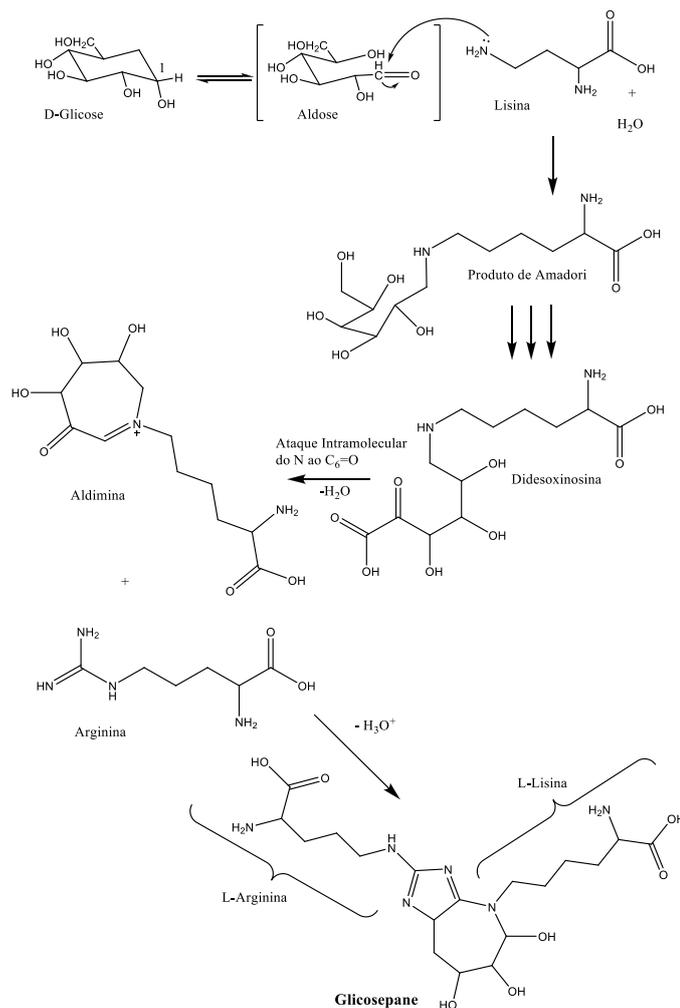
Tabela 2 - Doenças crônico degenerativas relacionadas com os AGEs.

Doença	Descrição	Natureza do envolvimento com os AGEs	Referências
Doença Cardiovascular (DCV)	As DCV são aquelas que afetam o coração e as artérias, como, por exemplo, infarto e acidente vascular cerebral, arritmias cardíacas, isquemias ou anginas. A principal característica das doenças cardiovasculares é a presença da aterosclerose, acúmulo de placas de gorduras nas artérias que impede e/ou prejudica a passagem do sangue.	<p>Acúmulo de AGEs <i>in vivo</i>, ao longo do tempo, ocasiona glicação dos aminoácidos do colágeno, contribuindo para alterações na estrutura e na função do sistema cardiovascular, como, por exemplo, enrijecimento arterial, anormalidades de relaxamento do miocárdio, formação da placa aterosclerótica e disfunção endotelial.</p> <p>AGEs diminuem a captação por receptores específicos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Isso ocorre por glicação da LDL na porção da apoproteína B e de seus fosfolipídios. A LDL glicada é mais susceptível ao cross-linking com o colágeno não sendo reconhecida por seu receptor específico. O acúmulo de LDL modificada inicia junto à ativação de macrófagos, o processo de formação do ateroma.</p> <p>AGEs diminuem a atividade do óxido nítrico (NO). AGEs reduzem a meia vida da NO sintetase, o que ocasiona a redução da vasodilatação endotelial.</p>	LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010; CUPPARI, 2005
Sarcopenia	A sarcopenia é uma síndrome caracterizada pela perda progressiva e generalizada da força e massa musculares, que ocorre em consequência, principalmente, do envelhecimento. A patogênese da sarcopenia é multifatorial e pode compreender alterações hormonais, aumento do estresse oxidativo e inflamação, alterações na vasculatura e inatividade.	AGEs podem contribuir para esta condição através do aumento do estresse oxidativo e da inflamação.	LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010
Doença Renal Crônica	É uma síndrome clínica decorrente da perda lenta,	AGEs e seus receptores estão envolvidos na patogênese da DRCR. O rim desempenha papel importante na depuração e metabolismo de AGEs e altas	LUEVANO-CONTRERAS;

(DRCR)	progressiva e irreversível das funções renais (glomerular, tubular e endócrina). Os indivíduos apresentam uma filtração glomerular <60 mL/min/1,73 m ² por, no mínimo, 3 meses.	concentrações séricas são observadas na DRCR, por um aumento do estresse oxidativo e carbonílico. Células do rim, como podócitos e células endoteliais, possuem RAGE. Através da ativação de RAGE, ocorre hipertrofia destas células com interrupção do ciclo celular e apoptose, migração alterada e produção de citocinas inflamatórias, ocasionando dano renal progressivo.	CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010; BUSCH et al., 2010; CUPPARI, 2005
Doença de Alzheimer (DA)	A DA é a forma mais prevalente de demência em idosos. É caracterizada por um declínio gradual e progressivo nas habilidades cognitivas e funcionais do indivíduo afetado.	AGEs estão relacionados com ações pró-oxidante e inflamatória presentes na fisiopatologia da DA. O estresse oxidativo, iniciado e/ou provocado pelos AGEs, tem sido identificado como um fator de risco primário da doença Formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares intracelulares são processos capazes de levar à perda de sinapses e morte celular neuronal, contribuindo para a diminuição cognitiva e de habilidades funcionais em pacientes com DA. A agregação e a deposição de proteínas derivadas de AGEs resultantes de ligações cruzadas foram observadas em ambas as placas e emaranhados neurofibrilares.	LI et al., 2012; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010
Diabetes	Grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia, um defeito na ação da insulina, secreção da insulina ou ambos.	Hiperglicemia aumenta o processo de glicação e conseqüentemente de formação de AGEs. Suspeita-se que a glicação de enzimas proteolíticas em diabetes reduz a sua eficiência, resultando em acúmulo de AGEs. AGEs têm sido implicados na retardada cicatrização de feridas associada com diabetes, presumivelmente através de danos vascular, neurológico ou modificações metabólicas.	SANTOS et al., 2013; IDF, 2012; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010
Doença do Fígado Gorduroso não Alcoólica	Engloba o espectro completo de doença do fígado gorduroso em indivíduos sem consumo significativo de álcool, indo desde o fígado gorduroso até esteato-hepatite e cirrose	Na hiperglicemia e peroxidação lipídica, a formação de AGEs e seus níveis estão elevados, contribuindo para o desenvolvimento/evolução da DFGNA Interação AGEs/RAGE em células estreladas hepáticas leva ao aumento de EROs e da proliferação e ativação dessas células, resultando em fibrose hepática e progressão da doença.	SANTOS et al., 2013; CHALASANI, et al., 2012

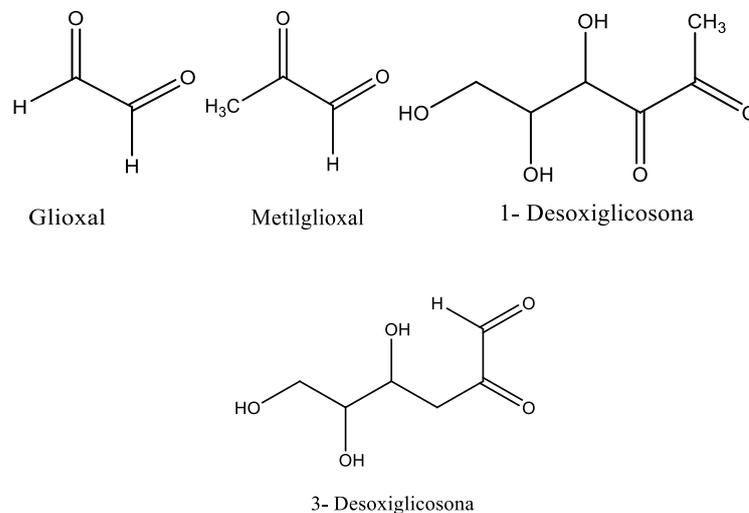
A reação de *Maillard*, também conhecida como glicação, é a mais frequentemente descrita na literatura como uma rota para a produção de AGEs. No entanto, vale ressaltar que estes produtos podem ser formados por meio de outros mecanismos. A glicação se inicia com a formação de bases de *Schiff* instáveis geradas pela condensação do grupo carbonila de um açúcar redutor (glicose, frutose, galactose e ribose) ou intermediários do metabolismo da glicose (glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ribose-5-fosfato, deoxirribose-5-fosfato e gliceraldeído) ou metabólitos de poliol (frutose ou frutose-3-fosfato) ou compostos dicarbonílicos originados da peroxidação lipídica (glioxal, malondialdeído (MDA)), com um grupo amina originado, por exemplo, a partir do aminoácido lisina (ou outros aminoácidos), ácidos nucleicos e lipídios (VLASSARA; STRIKER, 2010; VLASSARA; PALACE, 2002). Subsequentemente, a base de *Schiff* sofre rearranjos que tornam esta estrutura mais estável, formando produtos conhecidos como produtos de Amadori, que são produtos iniciais da reação de *Maillard*. Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonila reativos que se condensam com grupos amino primários, dando origem aos AGEs (Figura 3) (PIARULLI et al., 2013; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

Figura 3 - Formação de AGEs de açúcares redutores. Ataque nucleofílico no carbono anomérico do açúcar por Lisina presente em proteínas, formando produtos de Amadori. Alterações metabólicas que podem causar o aumento de produtos de Amadori são hiperglicemia (reação de *Maillard*), hipertrigliceridemia e aumento da gordura no tecido adiposo (peroxidação lipídica com formação de reativos carbonílicos e compostos dicarbonílicos), processos comuns em obesos e diabéticos tipo 2. Após sucessivos deslocamentos do grupo carbonila através do esqueleto de carbono do açúcar, o intermediário α -dicarbonila didesoxinosina é formado. O intermediário α -dicarbonílico sofre ataque nucleofílico intramolecular sobre o grupo carbonila pelo ϵ N, dando aldimina, um precursor plausível para o *cross-linking* Lisina-Arginina, glicosepano. ϵ N, nitrogênio terminal de lisina (Adaptado de Vlassara; Gary, 2010; Thornalley et al., 2003).



Alternativamente, os produtos de Amadori podem ser fragmentados por glicoxidação na presença de íons de metais de transição como o ferro, resultando na formação de compostos reativos de cadeia curta, glicoxal e metilglicoxal, que também são gerados durante fases glicolíticas acessórias ou durante a peroxidação lipídica (PL). Estes produtos podem também ser chamados de intermediários de produtos de glicação (IPGs) (Figura 4) e incluem glicoxal e metilglicoxal, que também são gerados durante fases glicolíticas acessórias ou durante a peroxidação lipídica (PL). Estes produtos podem também ser chamados de intermediários de produtos de glicação (IPGs) (Figura 4) e incluem glicoxal e metilglicoxal, que também são gerados durante fases glicolíticas acessórias ou durante a peroxidação lipídica (PL). Estes produtos podem também ser chamados de intermediários de produtos de glicação (IPGs) (Figura 4) e incluem glicoxal e metilglicoxal, que também são gerados durante fases glicolíticas acessórias ou durante a peroxidação lipídica (PL).

Figura 4 - Intermediários de produtos de glicação avançada (PGA). A decomposição oxidativa de produtos de Amadori leva à formação de uma grande variedade de compostos reativos carbonílicos e dicarbonílicos. Estes intermediários de produtos de glicação incluem glicoxal, metilglicoxal, 1-desoxiglicosona, 3-desoxiglicosona. IPGs pode também ser produzidos por autooxidação da glicose ou, no caso do glicoxal e metilglicoxal, por peroxidação de lipídios.

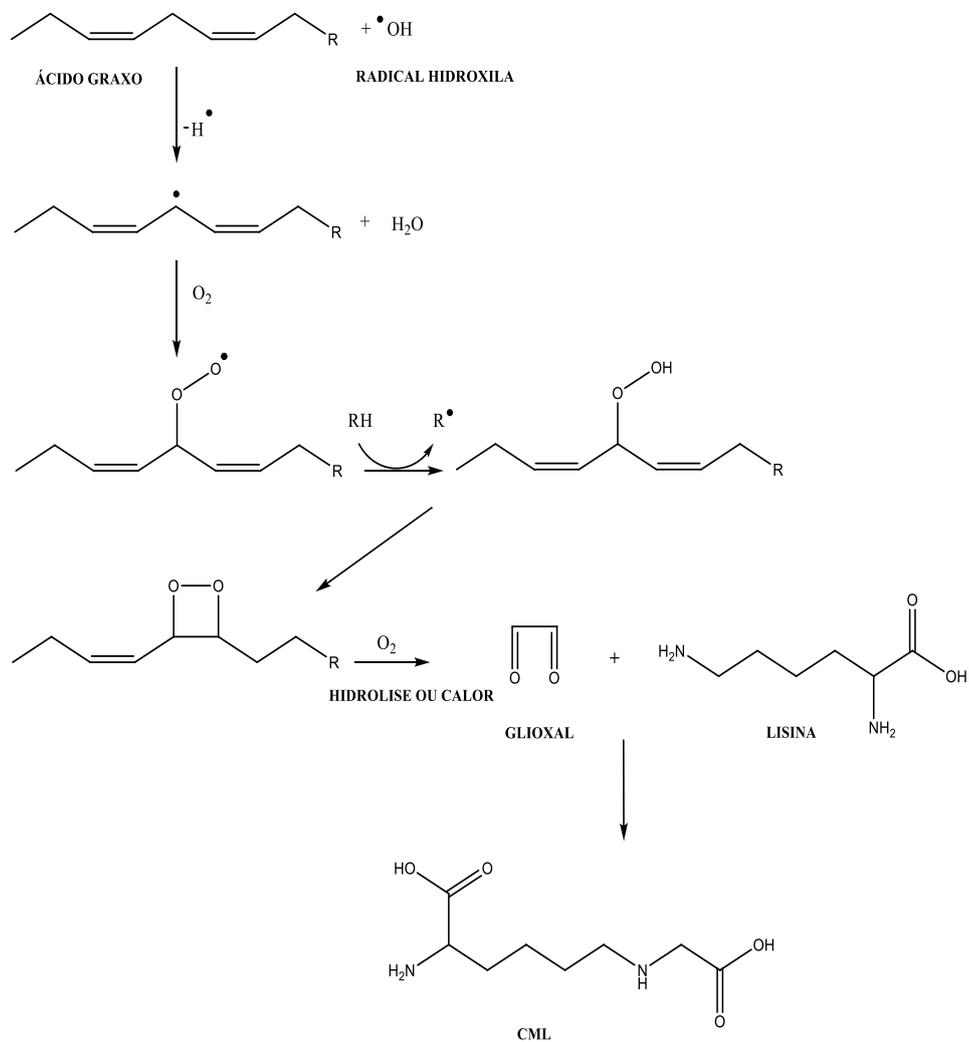


Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2010)

Para diabéticos e obesos diabéticos, a hiperglicemia é um fator que promove maior produção de compostos de Amadori. No entanto, a formação deste produto na obesidade está mais correlacionada com a PL, que também pode estar presente em pacientes obeso/ diabéticos. Esta é uma diferença importante entre a fisiopatologia do diabetes e da obesidade no desenvolvimento da doença hepática (PATEL et al., 2012; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; VLASSARA; PALACE, 2002; BROWNLEE

2001). Na DFGNA, os níveis aumentados de EO e PL estimulam a formação de AGEs, tais como a carboximetilisina (CML), a qual é também caracterizada como um produto de PL (Figura 5). Assim, é provável que na EH, esta etapa seja a mais importante para a geração de AGEs (KIMURA et al., 2010).

Figura 5 - Peroxidação lipídica e formação de AGEs. O radical hidroxila sequestra um átomo de hidrogênio do carbono sp^3 bis-alílico do lipídio conjugado, formando um radical de carbono e, em seguida, na presença de oxigênio, forma um radical peróxido, que é reduzido na presença de outro AGL para formar peróxido lipídico, que cicliza e gera peróxido cíclico, que na presença de oxigênio sofre quebra com formação de glicoxal, que reage com a lisina formando a CML. $\cdot OH$, radical hidroxila, $H\cdot$, hidrogênio radicalar; RH, lipídio; $R\cdot$, radical lipídico; CML, carboximetilisina.



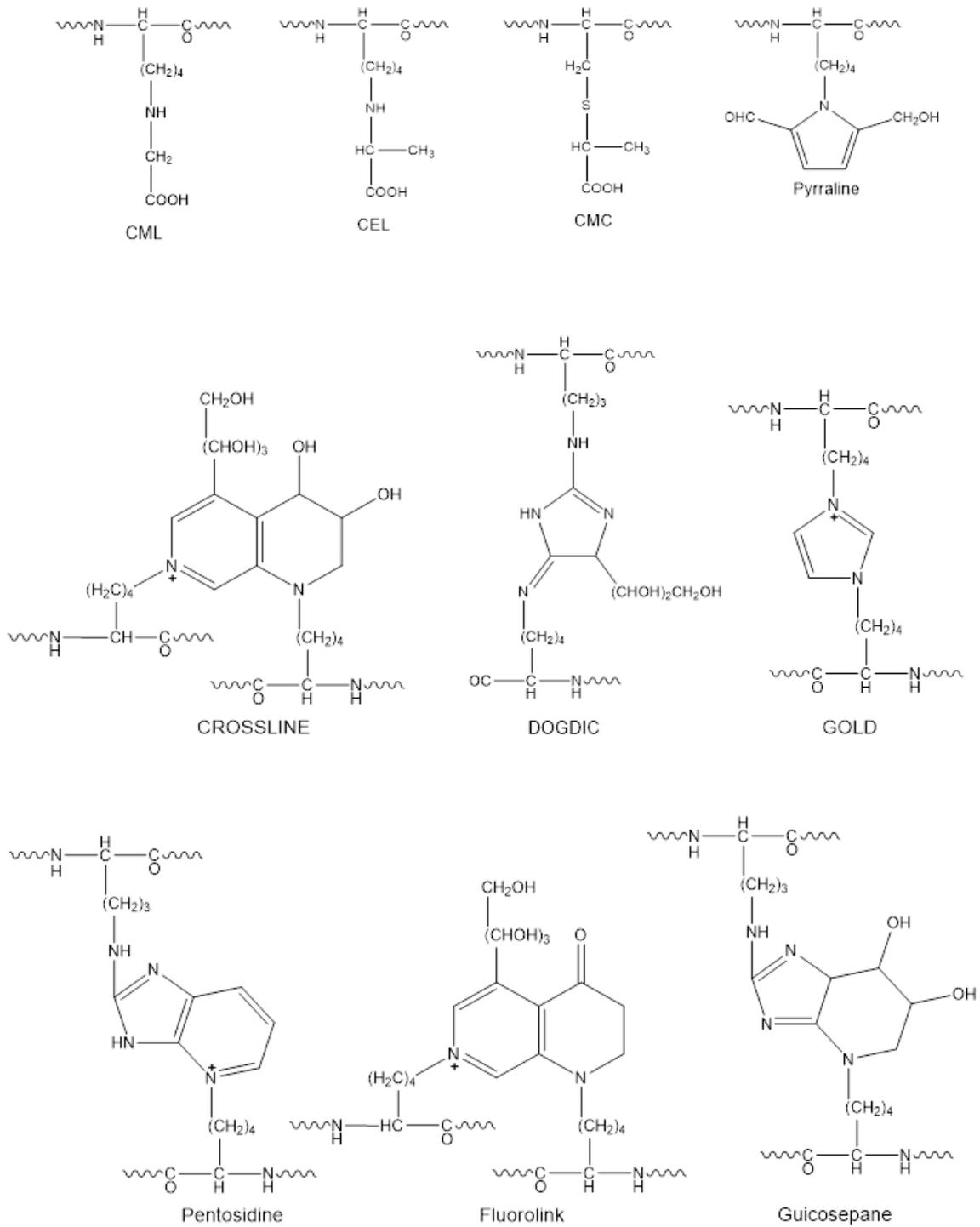
Fonte: Autora, 2014.

O aumento da produção de produtos de Amadori no meio celular pode resultar num dano precoce e irreversível, se não existirem os mecanismos de controle para limitar sua formação excessiva. Entre esses mecanismos, concentrações séricas controladas de glicose e proteínas, adequada permeabilidade celular à glicose mediada por insulina e a reatividade dos grupos amino de proteínas de meia vida longa, podem ser destacados. Co-morbidades associadas com a RI e hiperglicemia, por exemplo, obesidade e diabetes, resultam em um aumento descontrolado de produtos de Amadori, contribuindo para a formação acelerada de AGEs (PIARULLI et al., 2013; VLASSARA; STRIKER, 2010).

A formação de AGEs foi inicialmente associada à glicação de proteínas com meia vida longa, no entanto, especialmente na presença de hiperglicemia, este processo tem sido também observado em proteínas de meia-vida curta. O sintoma mais comum do envelhecimento, em nível molecular, é o acúmulo de proteínas intra e extracelularmente alteradas. O acúmulo de AGEs está relacionado com o desenvolvimento de danos vasculares, renais, da retina, hepáticos e complicações neurais do diabetes (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; BROWNLEE 2001).

AGEs circulantes consistem de proteínas plasmáticas modificadas por estas moléculas, como compostos AGEs de baixo peso molecular (por exemplo, AGEs peptídeos) e, os mais abundantes, adutos livres de AGEs (por exemplo, AGEs aminoácidos), originários de AGEs exógenos e gerados por modificação direta de aminoácidos circulantes ou liberados durante a degradação de proteínas modificadas por AGEs e outras macromoléculas (Figura 6) (VLASSARA; STRIKER, 2010; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; THORNALLEY et al., 2003; BROWNLEE 2001).

Figura 6 - Produtos de glicação avançada.



Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2009).

A remoção de AGEs ligados a componentes teciduais é realizada, principalmente, por proteólise extracelular e por células sequestradoras, como macrófagos teciduais que captam AGEs através de receptores específicos ou inespecíficos. Geralmente, moléculas modificadas por AGEs são reconhecidas e internalizadas por receptores da superfície celular via endocitose, degradadas intracelularmente e, posteriormente, lançadas como AGEs de baixo peso molecular, que incluem intermediários reativos com alta ligação cruzada ou reatividade oxidativa. Estes AGEs circulantes podem ser eliminados por qualquer depuração renal ou *clearance* hepático. Todos os mecanismos de depuração de AGEs diminuem com o avançar da idade (VLASSARA; GARY, 2010; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; THORNALLEY et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados com a sua capacidade de modificar as propriedades químicas e biológicas de moléculas nativas (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009). O fígado não é só um tecido alvo para os efeitos prejudiciais dos AGEs, mas também é um importante local para a depuração e catabolismo de AGEs circulantes. A remoção de macromoléculas senescentes é realizada por diversos tipos de células tais como os macrófagos, células de *Kupffer* (CK) e células hepáticas estreladas (CEHS). Foi reportado que após a administração intravenosa de albumina bovina modificada por AGEs (preparados *in vitro*), mais de 90% da proteína glicosada foram clarificados por CK e sinusoides hepáticos. Os mecanismos descritos acima para AGEs estão reduzidos no envelhecimento do fígado e na doença hepática, resultando em vazamento de AGEs para a circulação e sua deposição extra-hepática (YAMAGISHI, 2011; ASSIS, 2009).

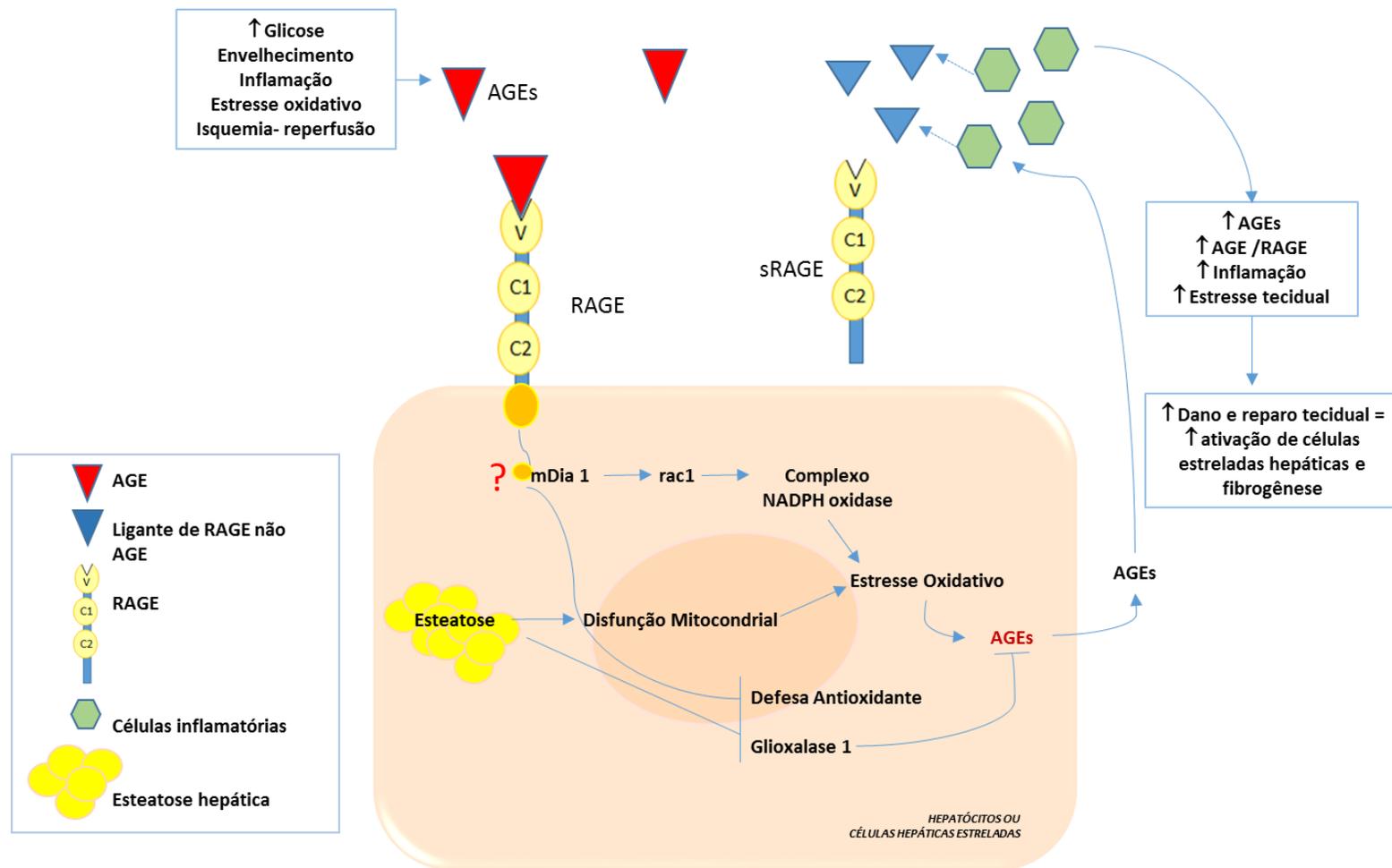
2.3 Receptores de produtos de glicação avançada (RAGE) e aumento do estresse oxidativo na doença hepática

Para atuar intracelularmente, os AGEs precisam se ligar a diversos receptores e proteínas ligantes como RAGE, AGE-R1 (OST-48, p60), AGE-R2 (80KH fosfoproteína), AGE-R3 (galectina-3), o receptor sequestrador de macrófago ScR-II e CD-36. Ao contrário de alguns receptores que frequentemente realizam

apenas a depuração de AGEs e liberação para os tecidos e circulação, as proteínas de membrana RAGE mediam diversas respostas celulares. RAGEs foram inicialmente encontrados em pacientes com diabetes, onde seu acúmulo gradual é responsável pela modulação da expressão gênica e produção de radicais e citocinas pró-inflamatórias (GELAIN et al., 2011; YAMAGISHI, 2011; THORNALLEY et al., 2003; BROWNLEE, 2001).

RAGEs são proteínas de aproximadamente 45 kDa. São membros da superfamília de imunoglobulinas da superfície celular e a sua expressão fisiológica é detectada numa variedade de tecidos, incluindo células endoteliais, músculo vascular liso, células mononucleares do sangue periférico e macrófagos, tecido neural, pulmão e músculo esquelético. Possui três domínios: um tipo V (variável) e dois tipo C (constante); além destes domínios, o RAGE possui uma região transmembrana de ancoragem, que fixa o RAGE na membrana, e uma pequena e altamente carregada cauda citossólica com 43 aminoácidos que são necessários à sinalização intracelular (SCHIMID; STERN, 2000). A habilidade de reconhecer vários ligantes é uma das características funcionais desta molécula, permitindo sua ampla participação em eventos fisiopatológicos relacionados principalmente à propagação da disfunção celular. Após aumento da atividade celular ou estresse, inflamação ou doença de *Alzheimer*, a expressão de RAGE está aumentada em células afetadas como um marcador de inflamação (Figura 7) (GELAIN et al., 2011; VASQUES, 2011; THORNALLEY et al., 2003).

Figura 7 - Estrutura e função de RAGEs. A família da RAGEs é composta por diferentes isoformas do receptor, entre os mais comuns, RAGE celular e sRAGE (RAGE solúvel). O sRAGE tem a capacidade de se ligar a AGEs sanguíneos e outras moléculas específicas impedindo a interação destes com receptores celulares, envolvidos com o estresse oxidativo. A geração e acúmulo de AGEs pode ser evidenciado durante a hiperglicemia, envelhecimento, inflamação, estresse oxidativo, isquemia e reperfusão. A ligação dos AGEs com RAGE leva à sinalização do domínio citoplasmático da mDia1 (em células do sistema cardiovascular), resultando na ativação da NADPHox e geração de EROs. Em células hepáticas, este processo ainda é uma hipótese. Outra forma de produção de EROs, na esteatose hepática, ocorre através da disfunção mitocondrial. A consequência do aumento da NADPHox e da disfunção das mitocôndrias é o consumo das defesas antioxidantes e da glicoxalase, acentuando o estresse oxidativo e os níveis de AGEs do meio. AGEs aumentados recrutam a expressão de células inflamatórias que expressam RAGE. Estas, quando ativadas, liberam ligantes de RAGE não-AGE, como *S100/calgranulins* e-HMGB1 (*high mobility group box 1*). Ambos ligantes de RAGE não-AGEs e AGEs podem ocasionar uma amplificação funcional do RAGE, levando ao aumento de AGEs, da inflamação e do estresse tecidual, como resposta ao dano. O reparo tecidual é estimulado pela ativação, principalmente, de células estreladas, com fibrogênese hepática e apoptose de hepatócitos, contribuindo para a evolução do dano hepático. AGEs, produto de glicação avançada, do inglês *advanced glycation end products*; sRAGE, receptor solúvel de produto de glicação avançada; RAGE, receptor de produto de glicação avançada; V, domínio variável; C1 e C2, domínios constantes; mDia 1, *diaphanous1*; rac1.



Fonte: Adaptado de Daffu et al. (2013).

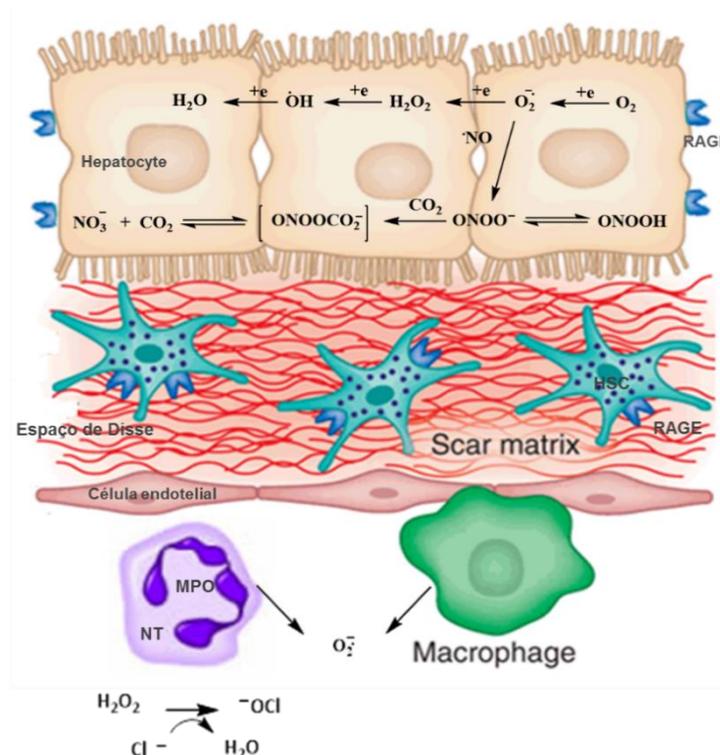
A interação AGEs/RAGE pode desempenhar um papel benéfico ou prejudicial nas atividades e destino dos AGEs. No primeiro caso, alguns receptores podem ajudar na remoção de AGEs da circulação e, conseqüentemente, podem diminuir os efeitos pró-oxidantes dos AGEs. As isoformas truncadas do RAGE, por exemplo, RAGE solúvel (sRAGE) e RAGE secretora (RAGEs), tem sido usadas como poderoso anti-inflamatório, agindo como uma armadilha para seus ligantes (KUHILA et al., 2011). No entanto, de acordo com Assis (2009) o receptor de AGEs e outros receptores parecem ativar uma resposta de estresse que desencadeia a inflamação e disfunção celular. A ativação de RAGE pode promover morte ou sobrevivência celular, dependendo do tipo de célula e das condições endógenas. Esta dupla função do RAGE é essencial durante o desenvolvimento, quando o controle da proliferação celular e apoptose são requeridos. Na idade adulta, sua expressão fisiológica é baixa, sendo aumentada por mediadores inflamatórios e acúmulo de ligantes RAGE, resultando na amplificação da produção de radicais livres e inflamação (GELAIN et al., 2011).

A sRAGE circula no plasma humano e vem sendo evidenciada como um biomarcador confiável em desordens mediadas por AGEs. Observa-se que os níveis de sRAGE foram recentemente associados a vários componentes da RI e da SM. De acordo com Yilmaz et al. (2009), que avaliaram a relação entre os níveis plasmáticos de sRAGE, RI, estado pró-inflamatório, parâmetros bioquímicos e histológicos de lesão hepática em um grupo de pacientes com DFGNA, observou-se que as concentrações de sRAGE foram significativamente menores nos pacientes com EHNA e definida como limítrofe da EHNA em comparação aos controles. Não foram encontradas diferenças significativas em pacientes com EH, em comparação aos controles. Estes achados sugerem que baixas concentrações de sRAGE estão associados às formas mais graves da DFGNA. Evidências sugerem que sRAGE pode atuar como uma armadilha de AGEs e outros ligantes pró-inflamatórias, impedindo a ligação de AGEs a um receptor RAGE ligado em larga extensão à célula (HUDSON et al., 2005; GEROLDI et al., 2006).

No fígado parece haver um padrão específico para a expressão de RAGE, com pouca ou nenhuma expressão em CK e CEHS e expressão em hepatócitos e

CHE, como observado em estudos com seres humanos e ratos. O papel potencial de RAGE em doenças hepáticas ou seu efeito protetor tem sido objeto de vários estudos. Pesquisas *in vitro* e estudos com animais mostram que o eixo ligante/RAGE desempenha um papel na ativação da sinalização intracelular, resultando em produção de citocinas, que podem estar associadas a processos de inflamação ou regeneração tecidual (Figura 8) (BASTA et al., 2011).

Figura 8 - Estresse oxidativo e expressão de RAGE hepático. Formação de EROs por redução de um elétron na etapa do O_2 . $O_2^{\cdot-}$ é formado em grande quantidade através da respiração mitocondrial. Durante dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 é formado. H_2O_2 também pode ser formado em peroxissomos. Se NO estiver presente, irão reagir para formar $ONOO^-$ e $ONOOH$. O peroxinitrito pode então reagir com o dióxido de carbono para gerar, em cascata, espécies hábeis para realizar nitração. No fluido extracelular, as CK e neutrófilos são fontes de $O_2^{\cdot-}$, e neutrófilos liberam a enzima MPO para produzir OCI^- a partir do peróxido de hidrogênio e cloreto. A presença de RAGE em hepatócitos e CHE aumenta o estresse oxidativo hepático. CK, Células de Kupffer; NT, neutrófilos; CHE, células hepáticas estreladas; MPO, mieloperoxidase, RAGE, receptores de AGEs.



Fonte: Adaptado de Jaeschke e Ramachandran (2011) e de Friedman (2008).

No trabalho de GAENS (2012), que avaliou biópsias hepáticas e amostras de soro de indivíduos obesos, observou-se que a coloração imuno-histoquímica de RAGE em biópsias foi específica e exclusivamente localizada na membrana dos hepatócitos com esteatose, enquanto os hepatócitos não esteatóticos não mostraram coloração para RAGE. A formação e o acúmulo de CML e a expressão de citocinas pró-inflamatórias durante a deposição de lipídios em cultura de hepatócitos *in vitro*, foram também estudados. O estudo *in vitro* demonstrou que o acúmulo de lipídios nos hepatócitos foi associado com o aumento da formação de CML e aumento da expressão de RAGE, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6) e proteína C-reativa (PCR), todos relacionados ao processo inflamatório. Estes resultados demonstram que o desenvolvimento de esteatose está associado com o acúmulo de AGEs e que CML pode ter um papel subsequente na indução da inflamação hepática através do aumento da expressão de RAGE.

Resultados recentes demonstraram que a interação AGEs/RAGE pode ocasionar EO, respostas inflamatórias atrasadas em vários tipos de células endoteliais, ativação de CEHS envolvidas na fibrogênese, aumento da expressão de proteína-C reativa e indução da RI, sugerindo um papel crítico destas moléculas na injúria hepática (BROWNLEE, 2001; ASSIS, 2009). Dados indicam que os AGEs podem causar danos às células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas e RI periférica, o que pode conduzir ao início e progressão do anteriormente imprevisível pré-diabetes para diabetes (BASTA et al., 2011; DESIC; ARAGON, 2011; FRIEDMAN, 2008; CAI et al., 2007).

Estudo *in vivo* confirmou que ratos alimentados com uma dieta rica em AGEs mostraram redução dos níveis da relação glutatona reduzida/glutatona oxidada e maiores concentrações de 8-isoprostanos (um produto da peroxidação lipídica) que os animais alimentados com uma dieta pobre em AGEs (CAI et al., 2007). O trabalho de Patel et al. (2012) reforça a hipótese de que a interação AGEs/RAGE pode levar ao EO e à inflamação hepática com posterior progressão da doença, independente de esteatose. Neste, foi demonstrado que a inflamação hepática focal foi detectada em ratos com 26 semanas de idade, alimentados com uma dieta rica em AGEs, enquanto que os animais alimentados com uma dieta

contendo uma quantidade regular de AGEs permaneceram sem inflamação, até o final do experimento (39 semanas). Isto é consistente com o conceito bem estabelecido que os AGEs dietéticos podem iniciar o estresse oxidativo através de receptores de AGEs expressos em células hepáticas. O fato de que a esteatose não é uma característica de fígado com inflamação, sugere que os AGEs dietéticos por si só são suficientes para causar inflamação hepática, independente da esteatose.

2.4 O papel dos EROs e AGEs na evolução da DFGNA

Os mecanismos para a geração de EROs ocorrem tipicamente nas mitocôndrias. Nesta organela, a reação ocorre na cadeia de transporte de elétrons, através de citocromo-oxidases, sendo a principal fonte de espécies reativas derivadas da redução univalente do O_2 , gerando radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ROLO et al., 2012; YAMAGISHI et al., 2011).

O tecido hepático normal gera níveis baixos de EROs, especialmente $O_2^{\cdot-}$ na mitocôndria e H_2O_2 , como uma função normal das várias oxidases. Cada hepatócito expressa superóxido dismutase (SOD_1 no citosol, SOD_2 na mitocôndria), glutathiona peroxidase (citoplasma e mitocôndrias), catalase (peroxissomos), tioredoxinas ($Trx1$ no citosol, $Trx2$ na mitocôndria) e peroxirredoxinas (Prx -I -II, -VI no citosol, Prx -III -V, nas mitocôndrias) (Figura 9). Contém ainda, glutathiona, em concentrações mM em todos os compartimentos celulares, vitamina E responsável pela quebra da cadeia radicalar em membranas celulares; além de manter o ferro intimamente ligado a proteínas de armazenamento ou de transporte (Figura 10) (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2011).

Figura 9 - Sistema antioxidante enzimático. Na esteatose hepática e na resistência à insulina, ocorre aumento da oferta de acetil-CoA para oxidação mitocondrial, com aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$; este pode ser reduzido a partir da SOD, com geração de H_2O_2 ; O H_2O_2 pode ser reduzido para H_2O pelo sistema das glutations ou reduzido para H_2O e O_2 pela CAT. O $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem ser oxidados pela Reação de Haber-Weiss ou Reação de Fenton a HO^{\cdot} , aumentando a peroxidação lipídica e o dano oxidativo às proteínas e ao DNA. SOD, superóxido dismutase; $O_2^{\cdot-}$, ânion radical superóxido; HO^{\cdot} , radical hidroxila; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; Fe, ferro; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; GR, glutatona redutase; GPx, glutatona peroxidase; CAT, catalase; H_2O , água; O_2 , oxigênio.

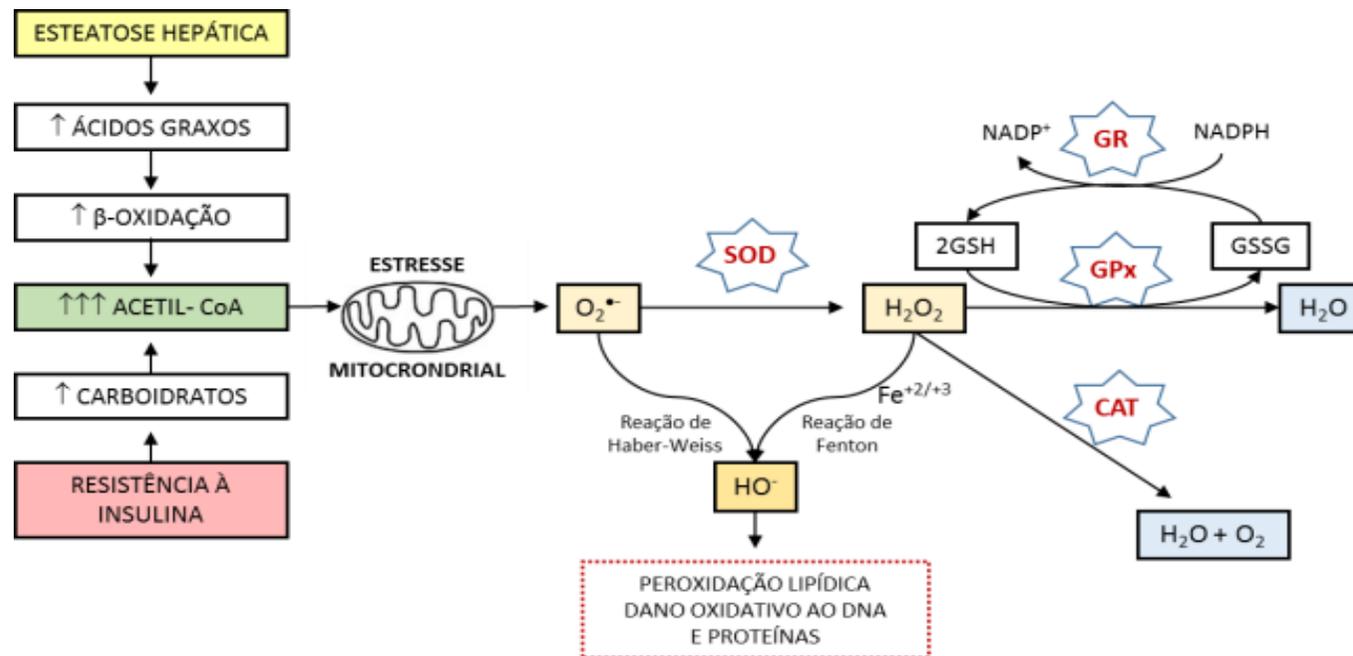
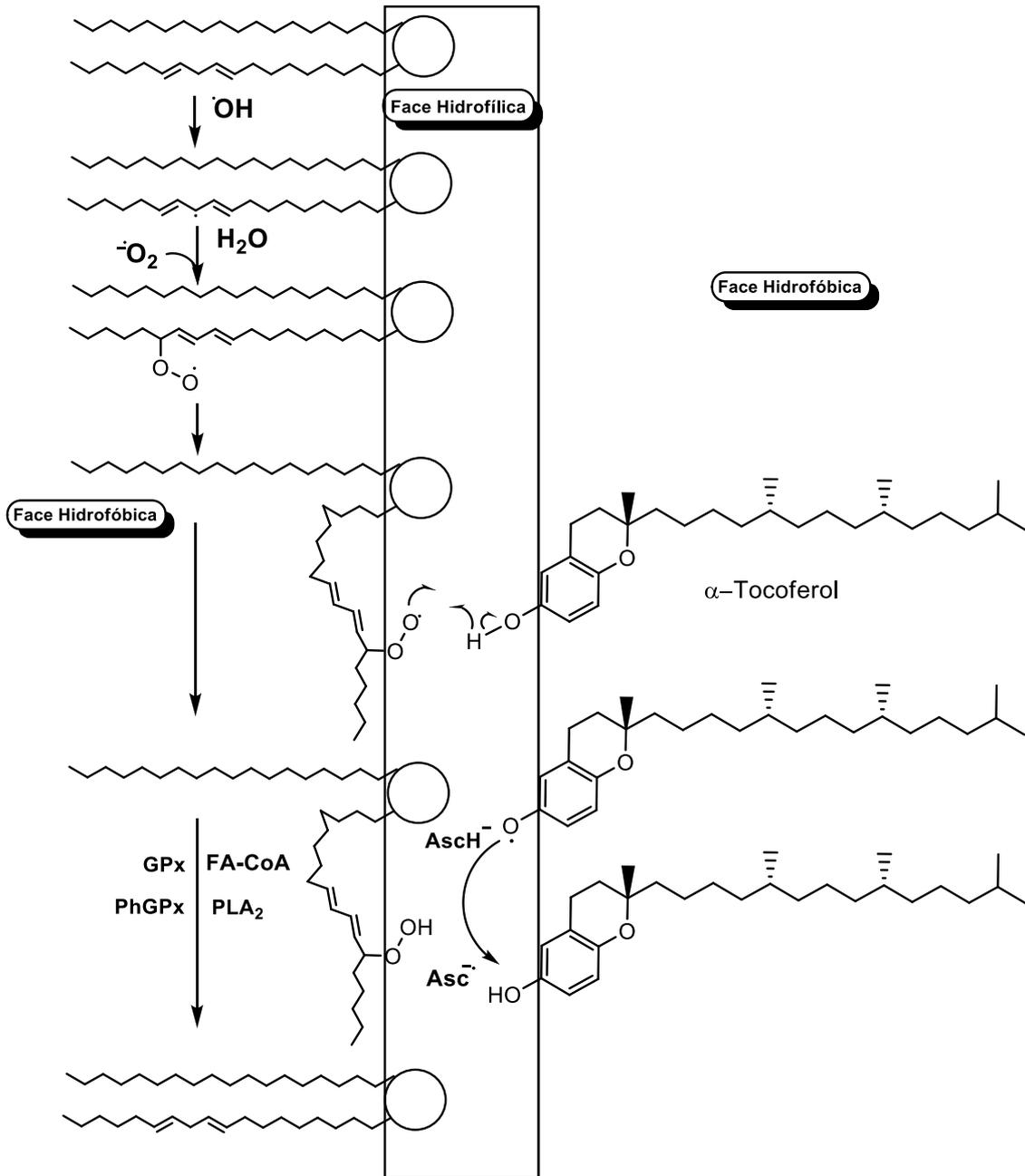


Figura 10 - Peroxidação lipídica e sistema antioxidante não-enzimático.



Fonte: Adaptado de Buettner (1993).

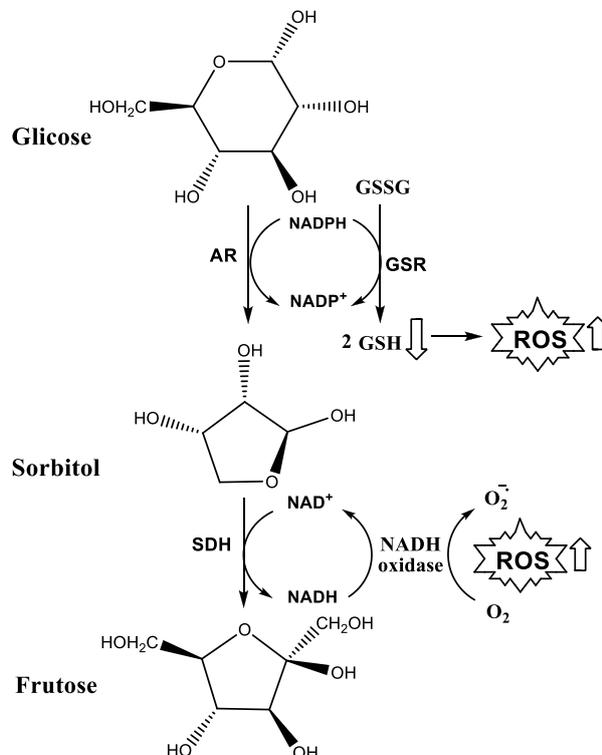
As reações de oxidação na mitocôndria (beta-oxidação, ciclo do ácido cítrico) estão associadas com a conversão de cofatores oxidados (NAD^+ e FAD) em cofatores reduzidos (NADH e FADH_2). Os principais sítios para a produção fisiológica de EROs são os complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons

mitocondrial. Durante o aumento do fornecimento de energia, a razão NADH/NAD⁺, a redução em nível do complexo I e a produção de EROs estão elevadas. Na RI, uma característica comum da DFGNA, o fluxo de AGL para a circulação devido à lipólise nos adipócitos está exacerbado, resultando em aumento da oxidação mitocondrial destes substratos no fígado e aumento da geração de EROs, uma vez que compartilham passos comuns da oxidação da glicose (ROLO et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2007).

Estudos com animais e humanos mostraram que o EO tem um papel importante na patogênese da DFGNA/EHNA (VETELÄINEN et al., 2007). Na ausência do consumo de álcool, pacientes apresentando SM ou qualquer de seus componentes envolvidos com a RI desenvolvem EH, devido ao aumento da lipólise no tecido adiposo e à entrega de AGL para o fígado. Neste caso, o tecido hepático torna-se mais susceptível ao EO devido ao acúmulo anormal de gordura em suas células, o que pode levar ao segundo estágio da DFGNA, com progressão da esteatose simples para esteato-hepatite e fibrose, caracterizados por inflamação (KUMAR et al., 2013).

Como descrito no presente trabalho, PL é importante para a geração de EROs e AGEs, no entanto, observa-se que RI e hiperglicemia também podem estar presentes em pacientes com DFGNA, contribuindo para o aumento da deposição de lipídio por lipogênese *de novo*. Portanto, a hiperglicemia pode induzir EO através dos mecanismos descritos acima, por formação direta de AGEs ou pela ativação da via de poli-ol. Na fase de poli-ol, aldose redutase (AR) usa NADPH para reduzir a glicose a sorbitol. Sob condições normais, a produção de sorbitol por aldose redutase é uma reação menos favorável. No entanto, sob condições de hiperglicemia, aproximadamente 30 a 35% da glicose é metabolizada por esta via. Neste momento, a disponibilidade de NADPH é reduzida, diminuindo assim a regeneração de glutathione e a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), aumentando o EO. Numa outra etapa da reação, a segunda enzima sorbitol desidrogenase oxida sorbitol em frutose com produção concomitante de NADH. Após aumento de NADH, NADPH oxidases produzem ânion radical superóxido. Além disso, eles também podem induzir a produção de ânion radical superóxido mitocondrial (Figura 11) (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; REIS et al., 2008; VETELÄINEN et al., 2007).

Figura 11 - Etapas para a formação de polioli e de EROs. Glicose na presença de AR e NADPH é reduzida, formando sorbitol e NADP⁺; sorbitol é oxidado na presença de SDH e NAD⁺, formando frutose e NADH. Durante a redução da glicose a sorbitol, em conjunto, a glutatona oxidada é reduzida a duas moléculas de glutatona pela glutatona redutase, na presença de NADPH. Em condições de maiores quantidades de glicose para redução a sorbitol, níveis mais baixos de NADPH estão disponíveis para a reação de redução da glutatona oxidada a glutatona, com um aumento de EROs. Quando de uma maior oxidação do sorbitol a frutose, haverá uma maior disponibilidade de NADH que, na presença de NADH oxidase e de oxigênio, provoca uma maior liberação de ânion radical superóxido, com consequente aumento de EROs. AR, aldose redutase, NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada; GSSG, glutatona oxidada; GSR, glutatona redutase, GSH, glutatona reduzida; EROs, espécies reativas de oxigênio, NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada; SDH, sorbitol desidrogenase; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo; O₂, oxigênio; O₂^{-•}, ânion radical superóxido.

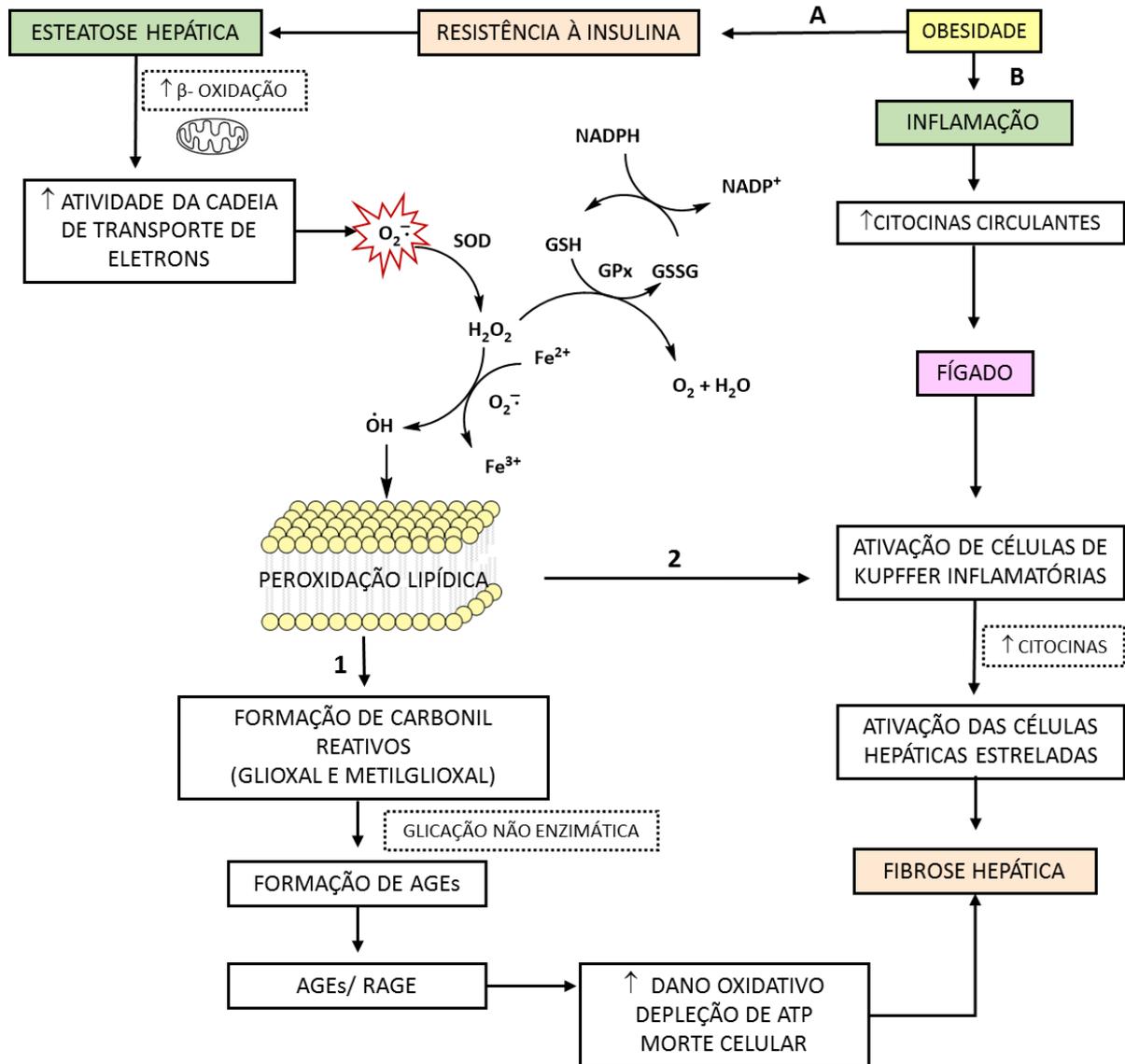


No metabolismo de sorbitol para frutose, frutose-1-fosfato é produzida com subsequente formação de gliceraldeído e di-hidroxiacetona, a partir de sua ruptura. Gliceraldeído pode ser metabolizado em gliceraldeído-3-fosfato e voltar à glicólise, ou reagir com os grupos amino, participando da formação de AGEs. A di-hidroxiacetona produz ácido fosfatídico e diglicerídeos, sendo este último também envolvido na produção de AGEs (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; VLASSARA; GARY, 2010; REIS et al., 2008; VETELÄINEN et al., 2007).

A SM e o processo de envelhecimento têm um desenvolvimento relacionada ao EO associada ao dano mitocondrial. Mitocôndrias danificadas produzem menores quantidades de trifosfato de adenosina e maior quantidade de EROs, levando ao EO e a um menor uso de carboidratos e lipídios. Esses macronutrientes não utilizados acumulam-se fora da mitocôndria, amplificando o processo de glicação, a produção de AGEs e doenças relacionadas (BUSCH et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A interação AGEs/RAGE resulta em geração intracelular de EO e, posteriormente, na ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, o que leva a uma maior resposta inflamatória e dano tecidual local (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; YILMAZ et al., 2009). EO também estimula a interação AGEs/RAGE, causando um aumento de AGE-dependente de RAGE e, assim, um círculo vicioso AGEs/RAGE aparece, onde EO é iniciado e acelerado (Figura 12, p. 61) (VASQUES, 2011).

Figura 12 - Evolução da esteatose hepática a esteato-hepatite: papel dos AGEs e estresse oxidativo, um ciclo vicioso. Obesidade está associada com RI (A) e inflamação (B). (A): RI provoca alterações metabólicas responsáveis pelo desenvolvimento de esteatose hepática. Oxidação de gordura está aumentada, com maior reação de beta-oxidação e atividade mitocondrial. O aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons leva à disfunção mitocondrial com subsequente formação de EROs; o O_2^- formado pode ser reduzido por sistemas enzimáticos para H_2O_2 (SOD) e por reação subsequente (GPx) à água; entretanto, esta reação com os metais de transição, como Fe^{2+} , pode levar à formação do $^{\bullet}OH$, com um ataque subsequente à membrana celular, resultando em peroxidação de lípidos (PL), em organelas intracelulares. Peroxidação lipídica: (1) Fonte de compostos reativos dicarbonílicos (intermediários reativos da glicação) que formam AGEs; (2) Ativação do sistema inflamatório e propagação via aumento do EO. Interação AGEs/ RAGE aumenta a formação de EROs, estes mecanismos levam ao dano oxidativo, depleção de ATP, morte celular, fibrose e progressão da doença hepática. (B) Citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo são direcionadas ao fígado, fortalecendo a ativação das CK inflamatórias junto às EROs, com a ativação de células estreladas hepáticas, contribuindo para o agravamento da fibrose. $O_2^{\bullet-}$, ânion radical superóxido; SOD, superóxido dismutase; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; OH^{\bullet} , radical hidroxila; Fe, ferro; GSH, glutathiona reduzida; GPx, glutathiona peroxidase; GSSG, glutathiona oxidada; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; $NADP^+$, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada; O_2 , oxigênio; H_2O , água; AGEs, produtos finais de glicação avançada, do inglês *advanced glycation end products*; RAGE, receptor de AGEs; ATP, trifosfato de adenosina.



Fonte: Autora, 2014.

Outras consequências do aumento do EO incluem inflamação do sistema hepático e ativação inflamatória sistêmica. A inflamação acompanha a maioria das doenças hepáticas agudas e crônicas e condições hepatotóxicas. Nestas condições, as células imunes residentes no fígado (por exemplo, CK, CHE) ativam respostas adaptativas, em uma tentativa de lidar com o EO. Nesta etapa, células que são recrutadas em resposta à injúria (por exemplo, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killers*) emitem sinais pró- inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1), quimiocinas, mensageiros lipídicos e EROs. Isto geralmente resulta numa ligeira inflamação, contribuindo para o restabelecimento da homeostase. No entanto, quando essas respostas adaptativas falham, os hepatócitos estressados podem sofrer apoptose ou necrose, agravando a resposta inflamatória. Tal resposta pode conduzir ao processo de fibrose, onde CK (e outras células do fígado) estimulam a população hepática aumentada de CHE, que são responsáveis pelo acúmulo progressivo de cicatrizes teciduais, devido a um desequilíbrio entre a fibrogênese e a fibrólise (KOEK et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2010; TRAUNER et al., 2010).

2.5 Modelos animais da DFGNA

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese da EH e EHNA. A utilização de modelos animais permite melhor entendimento de sua fisiopatologia e evolução para as fases mais avançadas da doença, além disso, possibilita o estudo dos mecanismos de ação de várias drogas e dietoterapias disponíveis para o auxílio de seu tratamento. No entanto, as desvantagens dos modelos animais são muitas vezes negligenciadas. A mais óbvia é que eles não são humanos e existem grandes diferenças das espécies em reação imune, expressão gênica/regulamentação metabólica, respostas farmacológica ou tecidual. A escolha do estímulo indutor da doença num modelo animal baseia-se na expectativa de que a resposta vai envolver mecanismos que são semelhantes àqueles que ocorrem na doença humana relacionada (STARKEL; LECLERCQ, 2011).

A indução da DFGNA tem sido realizada através de medicamentos (tetraciclina, amiodarona, corticosteróides, entre outros), com a utilização de ratos geneticamente obesos ou com manipulação genética, ou pela utilização de dietas que promovem a sua ocorrência, seja por serem ricas em gordura ou açúcar, seja pela restrição de aminoácidos (PATEL et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2007; HYOGO et al., 2007). Os modelos genéticos da DFGNA utilizam animais que possuem alguma mutação espontânea que promova a doença ou linhagens de animais geneticamente modificadas em laboratório (EDEAS et al., 2010; ZAMIN et al., 2009).

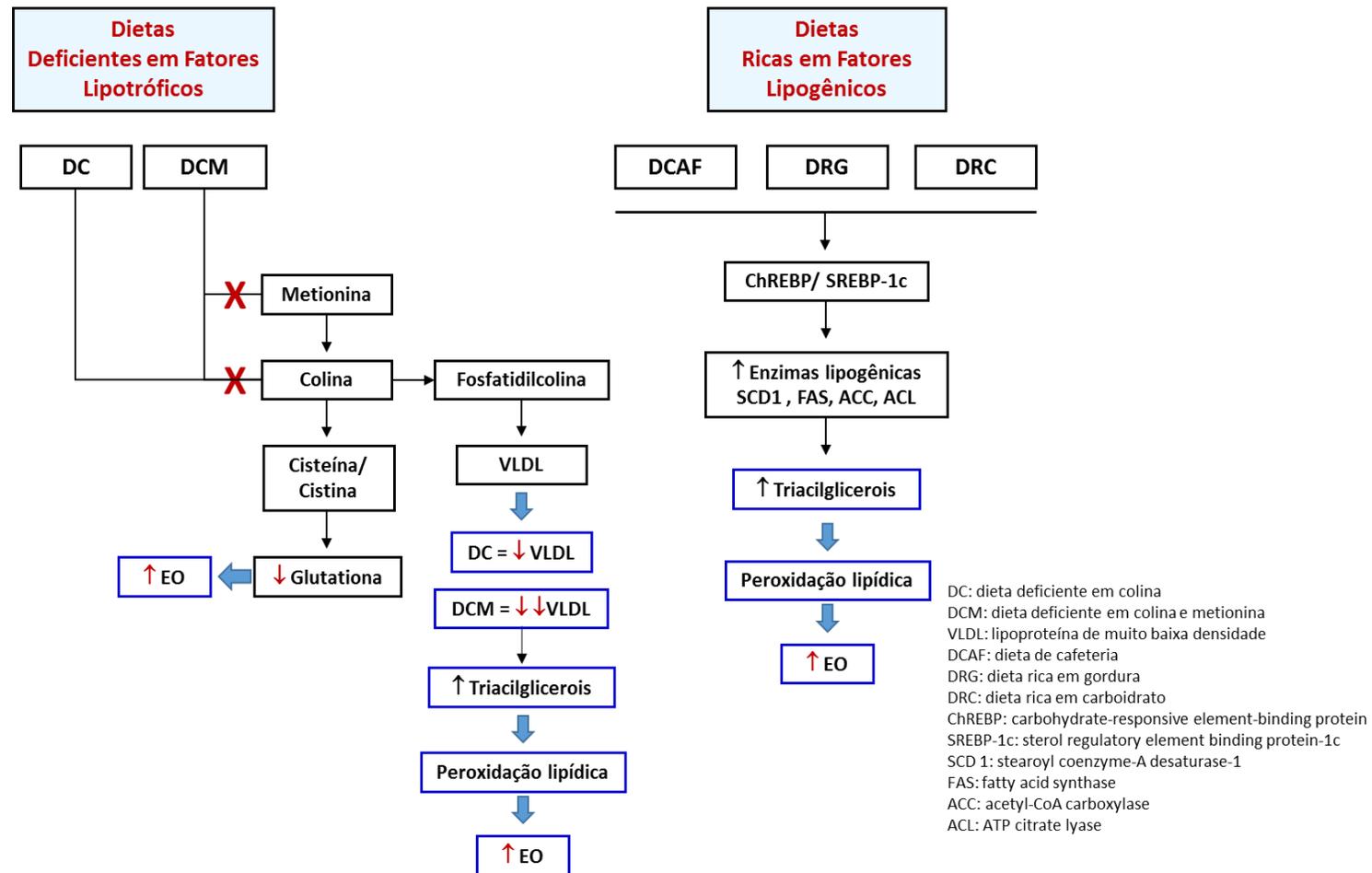
As mutações mais comuns são ratos *ob/ob* que apresentam mutação espontânea bloqueando a produção de leptina, com consequente hiperinsulinemia, hiperglicemia e dislipidemia e, desenvolvimento de esteatose; porém a esteato-hepatite somente ocorre se houver outro estímulo hepatotóxico como, por exemplo, o uso de alguma droga ou a indução de isquemia. Outra linhagem de ratos geneticamente obesos são os *fa/fa* que desenvolvem mutação espontânea no gene do receptor da leptina com resistência periférica à mesma e efeito final semelhante ao que ocorre com os ratos *ob/ob*, porém sem responder à administração exógena de leptina (ZAMIN et al., 2009). Ao contrário do que é visto no modelo *ob/ob*, ratos *db/db* possuem uma mutação natural no gene receptor de leptina (semelhantes aos *fa/fa Zucker*), desenvolvendo também obesidade, RI e esteatose macrovesicular. Estes animais também necessitam de um “segundo *hit*” para progredir para a EHNA (KANURI; BERGHEIM, 2013; STARKEL; LECLERCQ, 2011).

Desta maneira, todos os modelos experimentais deficientes ou resistentes à leptina apresentam obesidade, dislipidemia, RI, aumento do TNF α e doença do fígado gorduroso (KOTEISH; MAE DIEHL, 2002). Ratos com mutação natural ou aqueles geneticamente modificados para indução de esteatose e EHNA são excelentes modelos experimentais para estudo da doença, no entanto, são modelos onerosos, pela dificuldade de aquisição de linhagens com mutação espontânea ou pela necessidade de técnicas sofisticadas realizadas em laboratório de biologia molecular, pouco disponíveis em nosso meio (ZAMIN et al., 2009).

Outro mecanismo desencadeador da patologia constitui-se na deficiência de alguns componentes dietéticos na formulação utilizada para alimentação animal.

Nesse sentido, podem-se utilizar dietas que promovam a obesidade e a esteatose ou dietas que induzam somente a deposição de gordura hepática sem a ocorrência de obesidade (Figura 13). Dietas que induzem a obesidade e posteriormente a esteatose, como aquelas ricas em lipídios, carboidratos e sacarose, são frequentemente utilizadas. Entretanto, à semelhança dos seres humanos, os ratos apresentam respostas e suscetibilidade diferentes à dieta, sendo que tanto a ocorrência de obesidade como, posteriormente, a DFGNA, dependem de outros fatores, como idade, gênero e predisposição genética, podendo levar à obtenção de modelos patológicos não homogêneos que podem interferir no desenho experimental proposto para diversos estudos (CARILLON et al., 2013; HEBBARD; GEORGE 2011; ZAMIN et al., 2009; LIEBER et al., 2004).

Figura 13 - Diferentes modelos dietéticos indutores da DFGNA. Dietas deficientes em fatores lipotróficos (DC e DCM) impedem a via normal de produção de VLDL por retirada de colina e metionina da via de produção da fosfatidilcolina, constituinte da membrana desta lipoproteína, ocasionando acúmulo de TAG hepático, PL e EO. Estas dietas também diminuem a oferta de cisteína para a produção de glutathiona tornando, o órgão mais susceptível ao EO. Dietas ricas em fatores lipogênicos (DCAF, DRG e DRC) estimulam a produção dos fatores que regulam a expressão gênica de enzimas lipotróficas, ChREBP e SREBP-1c, aumentando a síntese de triacilgliceróis no hepatócito com consequente PL e EO. DC, dieta deficiente em colina; DCM, dieta deficiente em colina e metionina; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; DCAF, dieta de cafeteria; DRG, dieta rica em gordura; DRC, dieta rica em carboidrato; ChREBP, proteína ligadora do elemento regulador de carboidratos; SREBP-1c, proteína ligadora do elemento regulador de esterol; SCD 1, esteroil coenzima-A desaturase-1; FAS, ácido graxo sintetase ACC, acetil-CoA carboxilase; ACL, ATP citrate liase.



Estudo utilizando camundongos C57BL/6 com dieta *ad libitum* e água de beber com diferentes mono e dissacarídeos revelou que a frutose foi responsável pelo maior dano hepático e ganho de peso corporal (BERGHEIM et al., 2008). Semelhante ao demonstrado para modelos de DFGNA com dietas ricas em gordura (DRG), dietas ricas em frutose podem levar a RI, EO, expressão de citocinas pró-inflamatórias e SREBP1c no fígado e níveis elevados de endotoxinas no sangue portal, assim como alterações na expressão de adipocitocinas no tecido adiposo visceral, de acordo com a dose e o tempo de exposição (KANURI; BERGHEIM, 2013; SPRUSS et al., 2009; BERGHEIM et al., 2008). Além disso, outros estudos demonstraram várias alterações histológicas hepáticas após o consumo de frutose, incluindo inflamação focal e esteatose macrovesicular na região periportal e esteatose macro e microvesicular (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; SÁNCHEZ-LOZADA, 2010; ARMUTCU et al., 2005). No entanto, semelhante aos resultados obtidos para DRG, dietas ricas em frutose não causam lesão hepática tão grave como a encontrada nos modelos de dieta DCM (deficiente em colina e metionina), apesar de serem mais parecidas as alterações patológicas e moleculares e padrões dietéticos encontrados em humanos com DFGNA (KANURI; BERGHEIM, 2013).

A frutose passa passivamente a partir do lúmen intestinal para o sangue através do transportador de glicose 5 (GLUT5), que é o único transportador específico para a frutose, sem capacidade para transportar outras moléculas (DE M. BANDEIRA et al., 2013). A partir do sangue portal, a frutose é transferida através de membranas plasmáticas hepáticas por transportador de glicose 2 (GLUT2) ou GLUT5. No fígado, a frutose é convertida para a frutose-1-fosfato por frutoquinase e convertida por aldolase B em trioses fosfatos, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, que podem entrar na via glicolítica. No entanto, a glicose, para a síntese destas mesmas moléculas, percorre uma via diferente. Ao entrar na célula e ser fosforilada é posteriormente convertida em frutose-6-fosfato, que necessita de uma fosfofrutoquinase para produzir frutose 1,6-bifosfato. A frutose 1,6-bifosfato precisa ser clivada para a síntese de di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, substratos, quando em excesso, lipogênicos. Além disso, para a glicose, há um *feedback* negativo na atividade da enzima fosfofrutoquinase

por citrato e ATP (produtos do ciclo de *Krebs*), diminuindo o efeito lipogênico no excesso de glicose hepática. Já para a frutose, o mesmo não ocorre, contribuindo como uma fonte desregulada para o aumento de glicerol-3-fosfato e acetil-CoA, levando a um aumento da lipogênese (MALAGUARNERA et al., 2009). Este processo é reforçado pela sinergia com RI e/ou obesidade (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012; STYSKAL et al., 2012; MARRA et al., 2008).

No trabalho de Romero e Sarmiento et al. (2012), onde a EH foi induzida pela ingestão de sacarose associada à dieta padrão, tendo o óleo vegetal como fonte de lipídios, os achados histológicos mais importantes do estudo foram inflamação, hepatócitos globosos e esteatose, caracterizada por hepatócitos repletos de gorduras. O acúmulo de ácidos graxos no hepatócito associado ao consumo de frutose está relacionado ao aumento da lipogênese *de novo*, inibição da beta-oxidação, prejuízo da depuração de triglicerídeos e redução da exportação das lipoproteínas de muito baixa densidade (NOMURA; YAMANOUCHI, 2012).

Para modelos dietéticos ricos em gordura, estudos epidemiológicos sugerem que estas dietas podem ser um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade e RI. São consideradas DRG para indução metabólica de DFGNA quando 30% a 75% das calorias totais são derivadas de lipídios. As alterações decorrentes do uso desta dieta, como intolerância à glicose, dislipidemia, EO, expressão aumentada de reguladores da lipogênese (SRECP1 e receptor X hepático) e citocinas inflamatórias, ficam na dependência do período de alimentação com DRG e da combinação feita com ácidos graxos (KANURI; BERGHEIM, 2013; TAKAHASHI et al., 2012; STARKELE, LECLERCQ, 2011).

Foi visto que não somente a quantidade de gordura da dieta como também a composição de ácidos graxos são importantes para induzir a DFGNA e sua progressão. Um dieta com maior quantidade de ácidos graxos insaturados é mais susceptível à peroxidação lipídica, como observado em animais alimentados com óleo de peixe (mais rico em ácidos graxos insaturados), quando comparados com aqueles recebendo óleo de milho (NANJI, 2004). Outros estudos com dietas ricas em óleo de peixe para indução da EHNA demonstraram o desenvolvimento de características comuns à doença, como: níveis elevados de ALT, aumento da deposição de colágeno, aumento da incorporação de gordura, aumento do nível de

ácido ribonucleico (RNAm) para CYP2E1 e marcadores da peroxidação lipídica, inflamação e necrose (KANURI; BERGHEIM, 2013; TIPOE et al., 2009).

Outros pesquisadores, numa tentativa de trazer os modelos experimentais para mais próximo do padrão alimentar da população, desenvolveram as dietas de cafeteria (DCAF), que refletem com mais acurácia dietas altamente palatáveis, com alimentos energeticamente densos e prevalentes na sociedade ocidental, sendo um padrão alimentar associado com a pandemia da obesidade (CARILLON et al., 2013; SAMPEY et al., 2011). Como exemplo, têm-se o trabalho de Menezes (2010) que utilizou a dieta de cafeteria contendo 37% de ração padrão, 25% de amendoim torrado, 25% de chocolate em barra e 12,5% de bolacha maisena (composição final: 38% de carboidratos, 15% de proteína e 46,5% de gordura). Esta dieta promove, voluntariamente, hiperfagia resultando em rápido ganho de peso, aumento da massa de tecido adiposo e parâmetros pré-diabéticos, como intolerância à insulina e à glicose (CARILLON et al., 2013; SAMPEY et al., 2011; HEBBARD; GEORGE, 2011).

No estudo de Sampey (2011), comparando DCAF com DRG, foi demonstrado que as primeiras são um modelo de SM humana e induzem obesidade grave, EHNA, intolerância à glicose, inflamação sistêmica de baixo grau no tecido adiposo branco e marrom e, hepática. Além disso, uma extensa esteatose e distorção da arquitetura dos cordões celulares hepáticos foram encontradas em animais alimentados com DCAF, com esteatose microvesicular. Esteatose macrovesicular é considerada benigna e reversível, enquanto a microvesicular é maligna e precede a fibrose hepática.

Outros estudos não foram suficientes para demonstrar a relação entre DCAF e EH. Como exemplo, têm-se o trabalho com animais alimentados com DCAF de CARILLON et al. (2013) que reportou sobre a dissociação entre o desenvolvimento da RI e a inflamação hepática. Estes autores revelaram que DCAFs levam a um modelo inicial de RI induzida por obesidade com EO hepático. Entretanto, o estágio de inflamação crônica e esteatose não foram alcançados. De acordo com os autores, o período de exposição à dieta (19 semanas) pode ter sido insuficiente para o desenvolvimento destes processos. Outro fator importante a ser mencionado é a falta de informação da formulação administrada por cada autor como DCAF.

Neste contexto, dietas DCM têm sido utilizadas como modelo de experimentação animal, com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DFGNA. Na situação de deficiência destes componentes dietéticos, a esteatose é resultado da secreção hepática prejudicada de triacilgliceróis, devido à formação defeituosa de VLDL. Além disso, a β -oxidação de lipídios fica reduzida, contribuindo para a sua ocorrência. Ao contrário do que acontece com as dietas indutoras de obesidade, os animais que são alimentados com dieta deficiente em metionina e colina apresentam perda de peso e importante desnutrição (ZAMIN et al., 2009). A Dieta DCM foi descrita pela primeira vez por Rogers e Newberne, em 1973, ao observarem que poderia ocorrer o desenvolvimento de cirrose histologicamente semelhante à induzida pelo álcool, em um modelo animal apenas com manipulação dietética. Os pesquisadores verificaram também que quanto mais deficiente em aminoácidos, maior a velocidade de instalação e a gravidade da doença hepática.

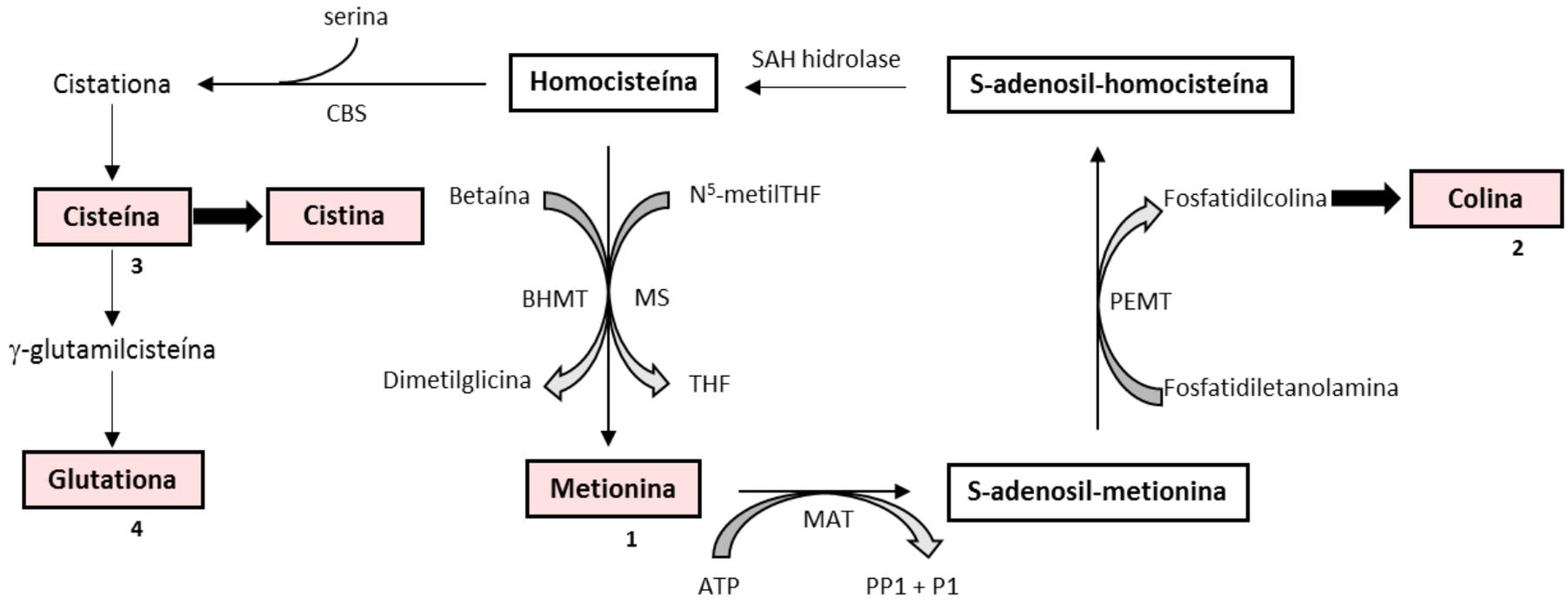
2.6 Dietas deficientes em fatores lipotróficos

Certas manipulações dietéticas causam EH de início rápido, o que as tornam atraentes para os estudos de investigação da patogênese da DFGNA bem como a sua prevenção e tratamento (SOON et al., 2010). A DCM é um modelo dietético bem estabelecido de EHNA e amplamente utilizado, devido à presença de características histológicas comuns à DFGNA em humanos. Embora os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de EH em decorrência da dieta DCM não estejam totalmente esclarecidos, estudos sugerem que a dieta DCM gera depósito de gordura no fígado, visto que a metionina e a colina atuam como fatores lipotróficos, substâncias dietéticas que previnem ou diminuem a taxa de deposição de quantidades anormais de lipídios no órgão e/ou que aceleram sua remoção (SHILLS et al., 2009).

A metionina está inserida no ciclo de formação da colina, cisteína e glutatona. Sua deficiência dietética ou a de qualquer um destes elementos, bem como de outros fatores envolvidos, pode levar ao acúmulo de gordura hepática, como descrito na Figura 14. Além disso, a queda da transulfuração e formação da cisteína reduzem os níveis de glutatona, diminuindo, assim, parte importante da defesa antioxidante intracelular.

A ingestão durante longos períodos de dietas pobres em colina tem consequências muito importantes, que incluem distúrbios hepáticos, renais, pancreáticos, de memória e de crescimento. A colina é uma amina quaternária essencial para o funcionamento de todas as células por ser um constituinte presente nas membranas celulares e mitocondriais, assegurando a integridade das mesmas e suas funções sinalizadoras (SHILLS et al., 2009). Além disso, é necessária ao transporte e metabolismo de lipídios, na circulação entero-hepática da bile e colesterol e fonte principal de grupos metila da dieta, atuando diretamente na neurotransmissão colinérgica, biossíntese de moléculas (incluindo regulação epigenética na expressão gênica) e ativação de receptores nucleares (CORBIN; ZEISEL, 2012; MARCOLIN et al., 2011; SHILLS et al., 2009; INNIS; HASMAN, 2006).

Figura 14 - Associação entre o metabolismo da colina, metionina, cisteína/cistina e glutatona. 1- a metionina, um aminoácido essencial, é ativada pelo ATP para formar S-adenosil-metionina, em uma reação catalisada pela MAT; 2- posteriormente a SAME, por meio da metilação da fosfatidiletanolamina, forma fosfatidilcolina e S-adenosil-homocisteína, numa reação catalisada por PEMT. A S-adenosil-homocisteína, um subproduto dessa reação, é hidrolisado pela enzima SAH hidrolase, gerando homocisteína. A homocisteína tem dois destinos metabólicos: remetilação ou transsulfuração. Na remetilação, a homocisteína adquire um grupo metila da N5-metilTHF (reação intermediada pela MS) ou da betaína (reação intermediada pela BHMT) para formar metionina. Na transsulfuração, o enxofre é transferido para serina, numa reação dependente de PLP e CBS; 3- após a formação de cistationa, outras reações em cadeia serão realizadas até a formação de glutatona. ATP, trifosfato de adenosina; MAT, metionina adenosiltransferase; SAME, S-adenosil-metionina; PEMT, fosfatidiletanolamina - N-metiltransferase; SAH hidrolase, S-adenosil-homocisteína hidrolase; N5-metilTHF, N5- metiltetraidrofolato; THF, tetraidrofolato; MS, metionina sintase; BHMT, betaína-homocisteína metiltransferase; PLP, piridoxal 5'-fosfato; CBS, cistationina β -sintase.



Fonte: Autora, 2014.

No entanto, os dois principais destinos da colina no organismo são: ser fosforilada e usada como constituinte do fosfolípido ou oxidada e usada como um doador de grupos metila (CORBIN; ZEISEL, 2012). A maior quantidade de colina do corpo encontra-se em fosfolípidos, como a fosfatidilcolina e a esfingomiéline. A fosfatidilcolina (lecitina) é o fosfolípido predominante (>50%) na maior parte das membranas dos mamíferos, além de ser um constituinte necessário para a montagem da partícula de VLDL.

A colina é geralmente considerada uma vitamina, porém, ao contrário da maioria das vitaminas, ela pode ser sintetizada endogenamente. A síntese *de novo* de colina ocorre por meio da metilação da fosfatidiletanolamina, em que o grupo metila é fornecido pela S-adenosilmetionina (SAME). Isso não significa que o consumo de colina não seja necessário, pois a deficiência da colina dietética resulta em várias disfunções quando outros nutrientes são limitantes (SAVOINI et al., 2010).

Como a colina é uma parte integrante da membrana mitocondrial, uma deficiência da mesma leva a uma disfunção desta organela, mecanismo também envolvido na patogênese da DFGNA. Sugere-se, que o complexo I é uma das principais fontes de EROs nas mitocôndrias hepáticas e, considerando que a composição de fosfolípidos nas mitocôndrias é alterada significativamente na dieta deficiente em colina, há a hipótese de que o complexo I da cadeia respiratória

mitocondrial, também conhecida como NADH:ubiquinona oxidorreductase, possa ser alterado em ratos submetidos à dieta deficiente em colina, interferindo na bioenergética e β -oxidação dos ácidos graxos. Além disso, ocorre também a oxidação da cardiolipina, um fosfolípido aniônico essencial para a função ótima de numerosas enzimas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial, e baixa concentração de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (CORBIN; ZEISEL, 2012; PETROSILLO et al., 2007).

Estudos clínicos controlados demonstraram inequivocamente que a colina é um nutriente essencial, seres humanos privados de colina desenvolveram esteatose e morte de células hepáticas ou danos ao músculo esquelético desenvolvido. Estes resultados foram reforçados pela evidência clínica de que pacientes alimentados com soluções de nutrição parenteral total deficientes em colina desenvolveram EH e lesões no fígado (CORBIN; ZEISEL, 2012).

Sobre os modelos dietéticos indutores de fígado gorduroso, recentemente tem havido um aumento da utilização de uma dieta deficiente em colina (DC) isolada. As fórmulas DC causam esteato-hepatite, mas o tempo de curso da doença é prolongado, em comparação com a que é causada pelas fórmulas DCM. Além disso, são também conhecidos pela sua capacidade de provocar fibrose hepática e carcinoma hepatocelular (MAHER, 2011). Apesar da dieta DCM desenvolver, significativamente, dano hepático de uma forma mais acentuada, esta restrição alimentar apresenta algumas limitações. Foi reportado que ratos submetidos a essa restrição dietética apresentaram perda de peso de até 35% em um período de 4 semanas. Tem sido demonstrado, também, em vários estudos, que a capacidade de resposta em cepas de ratos para a dieta DCM induzindo DFGNA varia consideravelmente (KANURI; BERGHEIM, 2013).

É importante ressaltar que muitas fórmulas comerciais DC e DCM não só carecem de metionina e colina, mas também contêm excesso de sacarose e gordura. Estes substratos lipogênicos aceleram a doença a ponto de desenvolver esteato-hepatite em 2 semanas, com focos de necrose e inflamação seguidos de fibrose pericelular e pericentral (KANURI; BERGHEIM, 2013; MAHER, 2011). Veteläinen et al. (2007) observaram que a dieta deficiente em colina induz esteatose menos severa, quando comparada com a progressiva inflamação e a fibrinogênese

induzidas pela dieta deficiente em metionina e colina, em ratos. O estudo demonstrou que dietas deficientes em colina e em metionina e colina representam dois modelos patogênicos diferentes de esteatose. Ratos e camundongos alimentados com dietas deficientes em colina e metionina são severamente exauridos de antioxidantes hepáticos, como a glutathione reduzida (GSH) e a S-adenosilmetionina. Tais animais são mais vulneráveis ao EO, uma situação que induz à síntese de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias. Agentes oxidantes e o TNF- α ativam a enzima inibidora da quinase Kappa beta (IKK β) nos adipócitos e hepatócitos, levando à RI e à DFGNA (KOTEISHI; MAE DIEHL, 2002; DAY, 2002).

Muitos estudos são ainda necessários para a elucidação de questões estratégicas relativas à repercussão dos produtos de glicação avançada para a saúde humana, em particular aos seus efeitos hepáticos, de modo a estabelecer intervenções seguras que previnam o surgimento de doenças crônicas ou melhorem a qualidade de vida dos milhões de portadores desses males. Desta maneira, modelos animais vêm sendo utilizados com o intuito de esclarecer pontos da fisiopatologia da DFGNA, em seus diversos aspectos. Entre estes, dietas deficientes em aminoácidos lipotróficos são utilizados, pela homogeneidade em seus resultados e características histológicas compatíveis com a doença hepática em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação no dano hepatocelular em ratos *Wistar* submetidos a dietas deficientes em fatores lipotróficos (colina e cistina).

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre a histologia hepática;
- ✓ Avaliar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre a glicemia e o lipidograma do animal;
- ✓ Avaliar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre as provas bioquímicas de função e lesão hepática;
- ✓ Avaliar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre o estresse oxidativo hepático;
- ✓ Avaliar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre a expressão de RAGE no fígado;
- ✓ Avaliar as repercussões das dietas em pó e peletizadas deficientes em fatores lipotróficos sobre a expressão de IL-1 β e TNF- α ;
- ✓ Avaliar a interrelação entre a expressão de RAGE, IL-1 β , TNF- α , e o estresse oxidativo no tecido hepático;
- ✓ Avaliar a interrelação entre os vários achados e o agravamento da doença hepática.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes: albumina bovina sérica (PTn), epinefrina, tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), ácido 5,5'-bisditionitro-2-nitrobenzóico (DTNB), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), catalase, reagente de folin-ciocalteu e 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) foram adquiridos da Sigma Aldrich; ácido clorídrico (HCl) e acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), cronoline Química Fina; ácido tiobarbitúrico (TBA), J.T. Baker; fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), hidróxido de sódio (NaOH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) da Vetec; ácido tricloroacético 25% (TCA) e ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), Dinâmica reagentes finos; peróxido de hidrogênio (H_2O_2) da Synth; anti-RAGE polyclonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti- β -actin monoclonal de mouse, Sigma; anti-p38 policlonal de coelho e anti-Akt, Santa Cruz; anti-IL1 β e anti-TNF α , ABCAM; anti-RAGE, (N-terminal), anticorpo produzido em coelho, Sigma; sódio dodecil sulfato (SDS)– gel para eletroforese de poliacrilamida (PAGE), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA); membrana de nitrocelulose (Hybond ECL), kit quimioluminescente (ECL plus), imunoglobulina anti-coelho (horseradish peroxidase-linked whole antibody from donkey), Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, UK).

4.1.2 Equipamentos

Agitador magnético AP 55, Phoenix, Biofreezer VIP Serie Sanyo, Espectrofotômetro UV/vis Thermo Scientific, microscópio óptico (Nikon 600N) acoplado a uma máquina digital Nikon 4500, UO126, Promega Corporation (Madison, WI, USA); GÖ6983 and SB203580, Merck Biosciences (Darmstadt, Germany), H89, Biomol.

4.2 Métodos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número 006549/2011-10, baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal – UNESCO - 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

4.2.1 Animais de experimentação, tratamento dietético e preparação das dietas

Setenta ratos machos *Wistar*, aos 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais (para mensuração de cota dietética ingerida) no Biotério Setorial da FANUT ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$; ciclo claro/escuro de 12 h), por 30 dias (estudo agudo). Os animais foram subdivididos em grupos ($n=10$) e submetidos a diferentes dietas: uma dieta controle comercial (Cont) (Nuvilab®) (Tabela 3) e as outras dietas confeccionadas a partir da dieta do *American Institute of Nutrition* (AIN) (REEVES, 1997) (Tabela 4), na versão 93, indutoras da DFGNA. Estas formulações foram divididas em: AIN-93Pp (AIN-93 na forma de pó; dieta padrão); AIN-93Ppel (AIN-93 na forma de peletes; dieta padrão); AIN-93DCp (AIN-93 na forma de pó; deficiente em colina); AIN-93DCpel (AIN-93 na forma de peletes; deficiente em colina); AIN-93DCCp (AIN-93 na forma de pó; deficiente em colina e cistina), AIN-93DCCpel (AIN-93 na forma de peletes; deficiente em colina e cistina). O conteúdo de sacarose da dieta original (10%) foi substituído por amido de milho, para reduzir o aporte de açúcares simples (similar a dieta controle). As dietas foram fornecidas pela RHOSTER Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, Brasil) (Tabela 4). As dietas pó e peletes foram processadas pela RHOSTER numa peletizadora à temperatura média de $70\text{-}80^{\circ}\text{C}$ e em seguida; as dietas em peletes foram secas em estufa ventilada por 2 h à temperatura média de 65°C .

Tabela 3 - Composição da dieta comercial.

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

▲ Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

● Percentual do total de energia

Tabela 4 - Composição da dieta AIN-93 nas versões AIN-93P, AIN-93DC e AIN-93DCC

COMPOSIÇÃO	P	DC	DCC
Total de energia (Kcal/kg)[▲]	3.719	3.719	3.719
Proteína (%)[●]	12,8	12,8	12,8
Carboidratos (%)[●]	77,5	77,5	77,5
Lipídios (%)[●]	9,7	9,7	9,7
Caseína (>85% proteína; g/kg)	140	140	140
Amido de milho (g/kg)	565,70	565,70	565,70
Amido dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos; g/kg)	155	155	155
Óleo de soja (g/kg)	40	40	40
Celulose microcristalina (g/kg)	50	50	50
Mistura mineral AIN-93 M (g/kg)	35	35	35
Mistura vitamínica (g/kg)	10	10	10
L-cistina (g/kg)	1,8	1,8	-
Bitartarato de colina (41,1% colina; g/kg)	2,5	-	-
†-Butilidroquinona (g/kg)	0,008	0,008	0,008

▲ Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

● Percentual do total de energia

Fonte: REEVES, 1997.

A dieta AIN-93 possui duas formulações, uma para crescimento (versão G-*growth*) e outra para manutenção (versão M- *maintenance*). Estas composições possuem caseína como proteína de escolha, a qual é insuficiente em fatores lipotróficos para alimentação destes animais. Por isso, são adicionadas colina e cistina e/ou metionina às versões originais, de acordo com a dieta G ou M (REEVES, 1997). A razão da escolha da dieta na versão M baseia-se em alguns fatos: menor quantidade de caseína e cistina, sem metionina suplementar (adicionada à versão G), pois o presente trabalho visou prioritariamente à indução do quadro de esteatose hepática. Sabendo-se que a versão de escolha não foi a apropriada em fatores lipotróficos, nem para o crescimento normal dos animais, por se tratar de uma composição para animais adultos, foi introduzido ao estudo um grupo controle alimentado com dieta comercial padrão.

A cistina é um aminoácido formado pela dimerização da cisteína, a qual tem como precursor a metionina. Na deficiência de cistina, portanto, mais metionina será utilizada para repor a carência de cisteína, ocasionando deficiência conjunta na produção de outros compostos dependentes de metionina, como a colina, e a glutatona (Figura 14), resultando em esteatose hepática e estresse oxidativo.

A partir dos tópicos resultados e discussão, será utilizada a sigla DCM quando se tratar trabalhos com o uso de dietas deficientes em colina e metionina. Na literatura, há um grande número de composições indutoras de esteatose hepática e boa parte dos trabalhos utiliza a restrição de metionina como gerador do dano hepático, por isso quando for necessário citá-los, em comparação a este trabalho, o faremos desta forma, de modo a facilitar a leitura.

4.2.2 Manejo e sacrifício dos animais

Os animais tiveram livre acesso à ração e à água durante os 30 dias do experimento. A ingestão dietética e o peso dos animais foram registrados semanalmente. Durante todo o experimento foram seguidos os cuidados propostos pelo *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996). Ao final do período experimental, após 12 horas de jejum, procedeu-se ao sacrifício, quando os animais foram pesados e anestesiados com ketamina e xilazina, e posterior abertura do tórax, em corte longitudinal realizado por bisturi e tesoura cirúrgica para, em seguida, proceder à coleta de sangue por punção cardíaca e logo depois retirada do fígado, o qual foi pesado e lavado em soro (Figura 15). Após a coleta, centrifugaram-se as amostras de sangue (3500 x g por 20 min, para obtenção do soro). Para as análises histológicas, fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram imersos em formol a 10%, para fixação. As porções remanescentes foram armazenadas a -80 °C para as análises do perfil redox e RAGE. Imediatamente antes das análises, o órgão foi homogeneizado em PBS 10 mmol L⁻¹ com aparelho Potter-Elvehjem e centrifugado (10.000g, 10 min a 4 °C) para remover restos celulares. Os sobrenadantes foram utilizados para todos os ensaios bioquímicos. A proteína tecidual foi quantificada, utilizando o método de Lowry (ZAIA et al., 1998).

4.2.3 Análises bioquímicas

Para determinação do perfil lipídico sérico, foram medidas as concentrações de triacilgliceróis, colesterol total, HDLc (lipoproteína de alta densidade), VLDLc (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDLc (lipoproteína de baixa densidade). Para a avaliação da integridade e função do tecido hepático, foram determinados os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (γ -GT), albumina e proteínas totais. Adicionalmente, a concentração de glicose sérica e de proteína C reativa foram determinadas. Todas as medições foram realizadas por meio de medidas espectrofotométricas, com emprego de *kits* laboratoriais.

Figura 15 - Sacrifício dos animais.

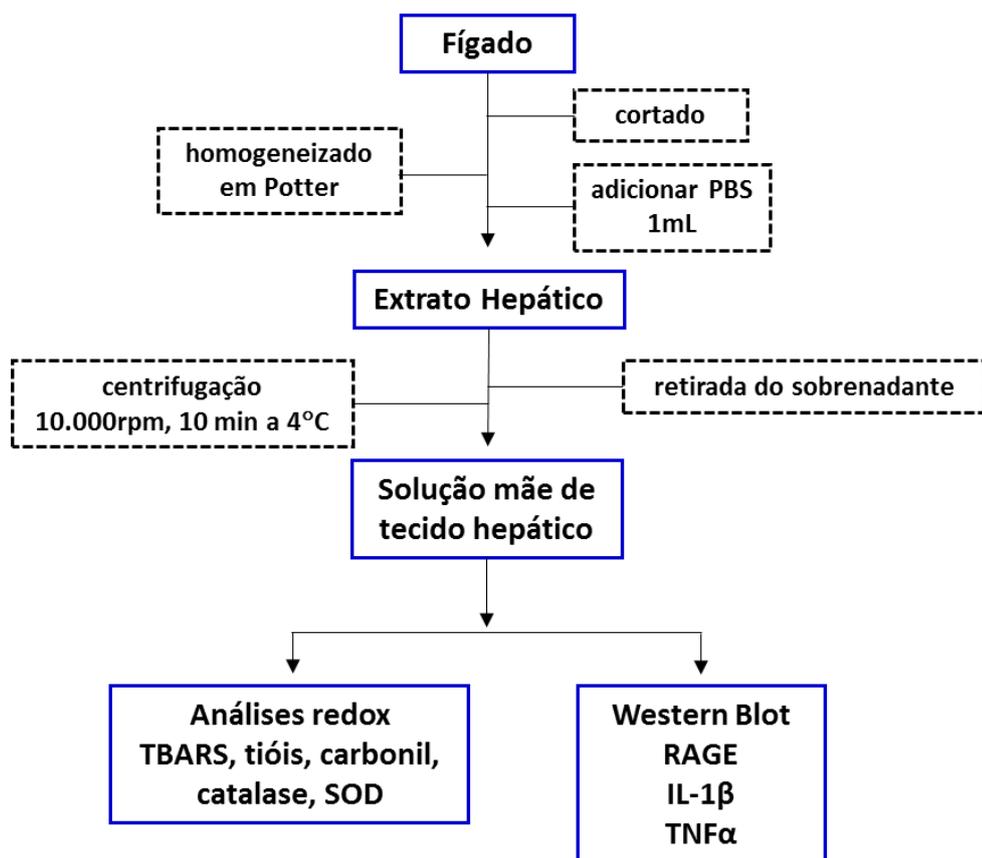


Fonte: Autora, 2014.

4.2.4 Preparo da amostra do tecido hepático

As amostras de fígado foram cortadas com o auxílio de um bisturi em pedaços de aproximadamente 1 g de fígado bruto; em seguida, colocou-se o fígado em um macerador potter e adicionou-se 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4). O extrato obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4 C°, centrifugado de duas a três vezes até se obter um sobrenadante homogêneo e parcialmente translúcido à luz, posteriormente, o sobrenadante foi retirado e armazenado em biofreezer, para análises de proteína, TBARS, tióis totais, proteínas carboniladas, catalase e SOD (Figura 16).

Figura 16 - Fluxograma do tratamento dado ao tecido hepático para realização das análises do perfil redox.



Fonte: Autora, 2014.

4.2.5 Dosagem de proteína pelo método de Lowry

Realizaram-se diluições do extrato do fígado para concentração de uma parte de extrato para 60 mL de tampão fosfato (1:60) e adicionou-se 1 mL de uma mistura contendo carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 2% em hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de cobre (CuSO_4) a 1% e tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). O preparado foi agitado em vórtex e incubado por 15 min. Em seguida adicionaram-se 100 μL de reagente de Folin-Ciocalteu em água destilada, usando o vórtex para homogeneizar. Após incubação por 20 minutos, foram adicionados 200 μL desse meio nos poços de placa UV/Vis, para realização de leitura em 750 nm. Nessa mesma placa, foi feita a curva padrão de albumina sérica bovina (ABS), que foi utilizada para a determinação da concentração dessa proteína. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em mg nmL^{-1} de solução (ZAIA, 1998).

4.2.6 Análise histológica do fígado

Após fixação em formol a 10%, o órgão foi lavado em álcool, clivado (adotando-se cortes transversais), desidratado em concentrações crescentes de álcool (70%, 90 e 100%) e, em seguida, submerso em xilol, sendo posteriormente incluído em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos num micrótomo rotativo (Leica RM 2135) e efetuada a sua coloração em hematoxilina-eosina (HE), para a elaboração das lâminas histológicas. A observação e análise histopatológica do tecido hepático foram efetuadas em microscópio óptico (Nikon 600N) ao qual está acoplada uma máquina digital Nikon 4500.

A avaliação histopatológica para determinação do dano hepatocellular baseou-se no *“The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology”* (CHALASANI et al., 2012).

4.2.7 Análises para avaliação do perfil redox hepático

4.2.7.1 Tiois reduzidos totais

As amostras de extrato hepático foram diluídas com PBS até um volume de 1 mL, para uma concentração de $2 \mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, de forma a ter 50 μg de proteína presentes em solução. Em seguida, agitou-se a diluição em vórtex e foram retirados 25 μL da solução, completando-se com 140 μL de tampão fosfato dibásico PBS 10 mmolL^{-1} (pH 7), com posterior adição de 35 μL de tampão (contendo 100 mmolL^{-1} de ácido bórico e 0,2 mmolL^{-1} de EDTA, em pH 8,5) ao final do preparo desta solução. Em seguida, adicionaram-se 10 μL de ácido 5,5'-bisditiocloro-2-nitrobenzóico (DTNB), a $0,01\text{molL}^{-1}$, observou-se uma intensa cor amarela após o tempo de incubação de 1 h, à temperatura ambiente, para então ser lido em $\lambda = 412 \text{ nm}$. O branco foi preparado simultaneamente, exceto pela adição de DTNB. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Calculou-se o conteúdo tiólico usando a equação (1) abaixo, (ELLMAN, 1959). Os resultados foram expressos em mol SH por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de tiois:

$$MolSH = \frac{(|com|DTNB) - (Branco|sem|DTNB) \times 0,00021}{9,434}$$

0,00021 = coeficiente de extinção molar

4.2.7.2 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de peroxidação lipídica, a formação de TBARS foi detectada através de reação a quente em meio ácido (DRAPER et al., 1990). Foram retirados 200 μL do extrato hepático e colocados em eppendorf com 184 μL de TCA 12%. Em seguida agitou-se em vórtex para então centrifugar por 10 min a 12.000 rpm a 4°C , para em seguida retirar 100 μL de sobrenadante e colocar em novo eppendorf, para então adicionar 200 μL de TBA 0,67% a quente (DRAPER et al., 1990). Aqueceu-se em banho-maria, por 30 min a uma temperatura de 100°C . Posteriormente, pipetou-se em placa e realizou-se a leitura em comprimento de onda de $\lambda = 532 \text{ nm}$. Obtiveram-se as concentrações de MDA a partir de uma curva de calibração realizada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano como solução padrão, submetido ao

mesmo tratamento aplicado aos sobrenadantes das amostras. Os resultados foram expressos como mmol de MDA por mg de proteínas.

Cálculo para a concentração de produtos de peroxidação lipídica:

$$\text{mmol de MDA/mg de PTn} = \frac{X}{\left(\frac{M_{PTn}}{V_{PTn}} \times 100\right) \times 1000}$$

X= concentração retirada da equação da reta;

M_{PTn} = massa de proteína no eppendorf;

V_{PTn} = volume de proteína;

100= volume da amostra colocada em placa;

1000= conversão de μg para mg.

4.2.7.3 Proteínas carboniladas

O dano oxidativo a proteínas, na forma de proteínas carboniladas como aldeídos e cetonas, foi mensurado pela quantificação de grupos carbonila, baseada na reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH). Preparou-se a amostra para obtenção de 1mg de proteína em solução, tanto no eppendorf com DTNB como no eppendorf com o branco; em seguida, completou-se o volume para 200 μL com PBS. Em seguida, adicionaram-se à solução, 100 μL de TCA, para precipitação das proteínas (ao final do preparo da solução, esta deverá conter 10% de TCA presente no eppendorf), agitou-se em vórtex e foi realizado repouso em gelo por 5 min, para então centrifugar-se por 5 min, a 7.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado com 100 μL de NaOH a 0,2 M, em vórtex. Nos eppendorfs com amostra foram adicionados 100 μL de DTNB 10mM e ao branco 100 μL de HCl 2M para, em seguida, agitar em vórtex. Incubou-se por 1 h, agitando-se em vórtex de 15 em 15 min. Posteriormente, adicionaram-se 100 μL de TCA a 20% e centrifugou-se por 10 min a 11.000 rpm. Os peletes formados foram lavados 3 vezes com 500 μL de etanol/acetato de etila (1:1). Em seguida, centrifugou-se a 11.000 rpm por 10 min para então descartar o sobrenadante. Os peletes foram ressuspensos com 1mL de solução de uréia a 8M, pH 2,3. Centrifugou-se por 10 min a 11.000rpm

para remoção de qualquer material insolúvel, transferiram-se 200 µL da solução para a placa e procedeu-se à leitura em comprimento de onda de $\lambda = 370$ nm (LEVINE et al., 1994). Todas as amostras feitas em triplicata e os resultados expressos em nmol de carbonila por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de carbonil:

$$\text{nmol de carbonil/mg de PTn} = \frac{(\text{ABS}) \times 0,2 \times 5 \times 1000}{22 \times 0,67 \times m}$$

ABS = (Absorvência tubo DNPH - Absorvência tubo branco);

Coefficiente de extinção (DNPH) = $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

0,67 = distância do caminho óptico da placa (cm);

0,2 = volume (mL) usado na leitura da placa;

1000 = mL para transformação em mol de carbonil;

5 = razão do volume de proteína em ureia (1000 µL) e o usado para ler na cubeta (200 µL). Ou seja, $1000/200 = 5$

mg = miligrama de proteína usada no poço.

4.2.7.4 Catalase

A atividade da catalase foi medida segundo Paton et al. (2009), como descrito previamente por Aebi (1984). Utilizou-se a taxa de redução na Absorvência a 240 nm, como índice de degradação do H_2O_2 por catalase. Uma unidade de catalase (CAT) foi considerada como a quantidade de enzima necessária para degradar $1 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}$ de H_2O_2 a $25 \text{ } ^\circ\text{C}$. Adicionaram-se 7,5 µL de extrato hepático com concentração de $2 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, 187,5 µL de tampão fosfato; ao branco, adicionaram-se 7,5 µL de H_2O destilada mais 187,5 µL de tampão fosfato; posteriormente 5 µL de H_2O_2 aos poços, então procedeu-se à leitura de 15 em 15 s durante 5 min, em comprimento de onda de $\lambda = 240$ nm. Todas as amostras foram

feitas em quintuplicata e os resultados foram expressos em U de catalase por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de catalase:

$$\text{catalase U/mg de PTn} = \frac{2,361 \times 0,67 \times (\text{ABS i} - \text{ABS f})}{(\text{ABS i}) \times \text{mg de PTn}}$$

ABS i = Absorvência inicial;

ABS f = Absorvência final;

0,67 = fator de correção do método da cubeta em relação à placa, caminho óptico;

mg proteína = quantidade de proteína (em mg) pipetada no poço.

4.2.7.5 Superóxido dismutase (SOD)

O método se baseou na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela enzima superóxido dismutase (SOD), presente na amostra biológica. Preparou-se 1 mL de catalase a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, a função da catalase é reduzir o H_2O_2 , formado como produto da SOD, em H_2O e O_2 . No poço, pipetaram-se $5 \mu\text{L}$ de solução de catalase mais $7,5 \mu\text{L}$ de amostra, com concentração aproximada de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, originando $15 \mu\text{g}$ de proteína presente no poço. Adicionaram-se $182,5 \mu\text{L}$ de tampão glicina (pH 10,2), contendo um volume total de $195 \mu\text{L}$ no poço, foi feita a leitura desta solução, como branco, com um comprimento de onda de $\lambda = 480 \text{ nm}$. Em seguida, foram adicionados $5 \mu\text{L}$ de adrenalina (epinefrina) e novamente foi feita a leitura cinética de 15 em 15 s durante 15 min. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteína.

Cálculo para a concentração de SOD:

$$\text{U SOD/mg PTn} = \frac{1000}{X \times C. \text{PTn}}$$

1000 = fator de conversão para mg de SOD;

X = valor do produto das regressões lineares;

C. PTn= concentração de proteína.

4.2.8 Análise de *Western Blot* para RAGE, IL 1- β , TNF- α no tecido hepático

Proteínas (20 μ g) foram separados por eletroforese com gel de poliacrilamida/ dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10% (p/v) de acrilamida, 0,275% (p/v) de bis-acrilamida. Posteriormente, as proteínas separadas pelo gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas em TBS-T (20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5, 137 mmol L⁻¹ NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina, por 1 h, à temperatura ambiente. Subsequentemente, as membranas foram incubadas por 12 h com um dos anticorpos primários apropriados [anti-IL1 β , anti-TNF α , ABCAM; anti-RAGE, (N-terminal), anticorpo produzido em coelho, Sigma; a diluição foi de 1:1000, anti- β -actina, diluição 1:1000, Cell Signaling®] lavadas com TBS-T e incubadas com anti-IgG conjugada com peroxidase por 2 h, à temperatura ambiente. As bandas quimioluminescentes foram detectadas, usando filmes de raios X e análises de densitometria foram realizadas, utilizando o programa Image-J®.

4.2.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados, após verificação dos pressupostos para análise paramétrica, através de análise de variância (ANOVA) e teste F de Snedecor. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se nível de até 5 % de significância. Realizou-se teste de correlação de Pearson, assumindo o mesmo nível de significância, 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

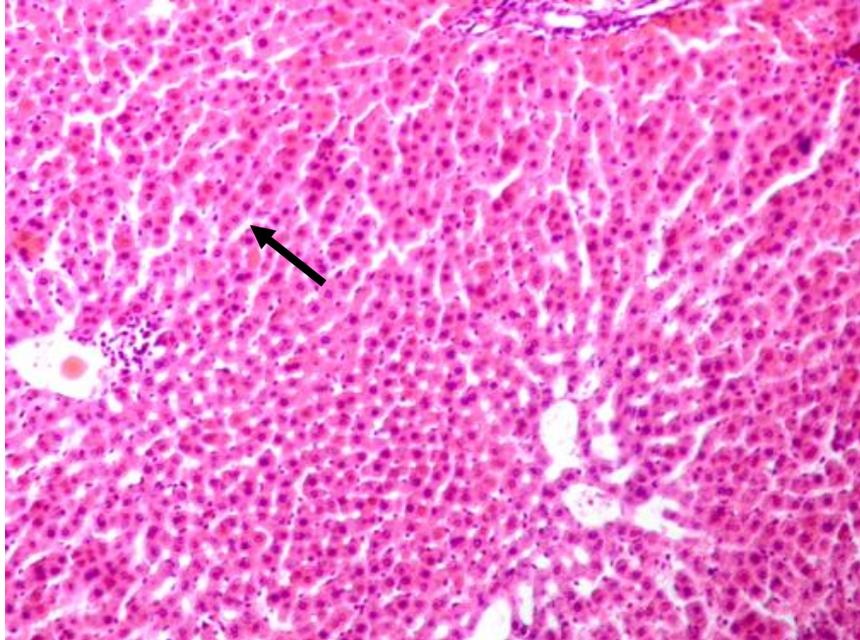
5.1 Histologia hepática

Os animais alimentados com a dieta AIN-93 por trinta dias apresentaram dano hepatocelular, independente da manipulação dietética. Esta fórmula padrão purificada foi a de escolha no experimento por, em trabalhos anteriores, ser observada esteatose hepática em ratos alimentados com a mesma dieta, em diferentes contextos (LUCENA et al., 2010; ATAÍDE et al., 2009; SILVA et al., 2008), sugerindo problemas com a sua composição. Dentre algumas hipóteses sugeridas por estes autores, uma delas é que a quantidade adicionada de aminoácidos sulfurados e colina não estão adequados. Diante disto, foram propostos dois modelos dietéticos de doença hepática com retiradas de diferentes fatores lipotróficos (Figura 13, pág.66).

A análise histológica dos grupos experimentais permitiu observar que nos animais do grupo Cont, houve manutenção de todas as estruturas celulares com cordões hepáticos alinhados, sem a presença de vacúolos de gordura ou de infiltrado inflamatório (Figuras 17 e 18).

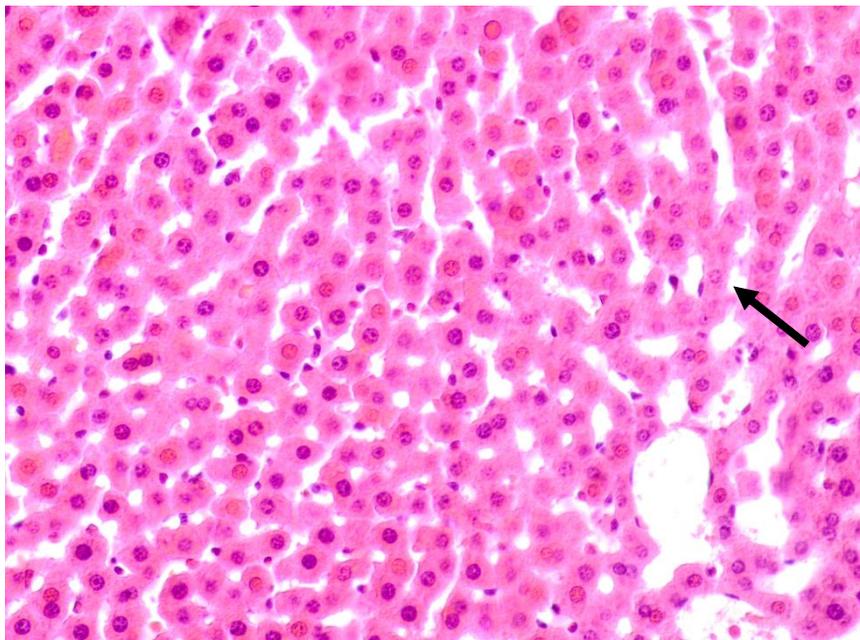
No estudo do tecido hepático para os animais alimentados com as dietas AIN-93, foi visto que a peletização da dieta não foi capaz de provocar danos teciduais diferenciados para as formulações em pó ou peletes. Os animais dos grupos padrão (Pp e Ppel) apresentaram esteatose hepática leve, com desorganização dos cordões hepáticos próxima à região periportal (Figuras 19 e 20). Os animais do grupo DC (DCp e DCpel) apresentaram intensa esteatose hepática, independente da zona avaliada, desorganização dos cordões hepáticos em todo o corte tecidual, hepatócitos balonizados, infiltrados inflamatórios, morte celular e indícios de fibrose (Figuras 21 e 22). Para os animais do grupo DCC (DCCp e DCCpel) encontrou-se desorganização dos cordões hepáticos similar ao grupo DC, hepatócitos com aumento de tamanho dos núcleos e/ou desestruturação destes, corpúsculos de *Mallory* e morte celular; com ausência de hepatócitos balonizadas ou infiltrado inflamatório (Figuras 23 e 24).

Figura 17 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Cont. Aumento 30x. Seta: Manutenção das estruturas celulares e cordões hepáticos alinhados, sem presença de vacúolos de gordura ou infiltrados inflamatórios.



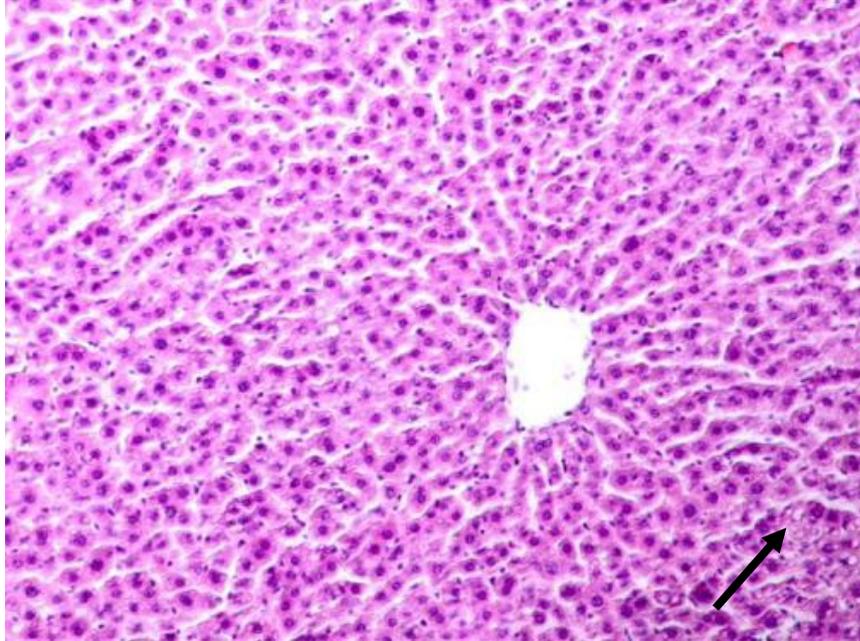
Fonte: Autora, 2014.

Figura 18 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Cont. Aumento 40x. Seta: Núcleo do hepatócito centralizado, célula de estrutura compatível com a normalidade.



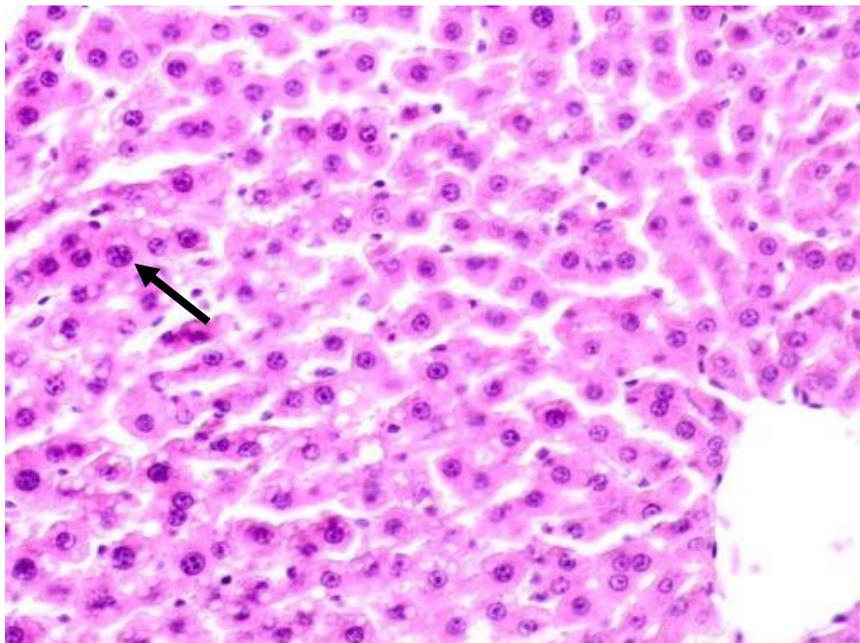
Fonte: Autora, 2014.

Figura 19 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Padrão AIN 93 (P). Aumento 20x. Seta: Desorganização dos cordões hepáticos próximo a região periportal e esteatose hepática.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 20 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo Padrão AIN 93 (P). Aumento 30x. Seta: Acúmulo de vacúolos de gordura intracelular e núcleo aumentado.



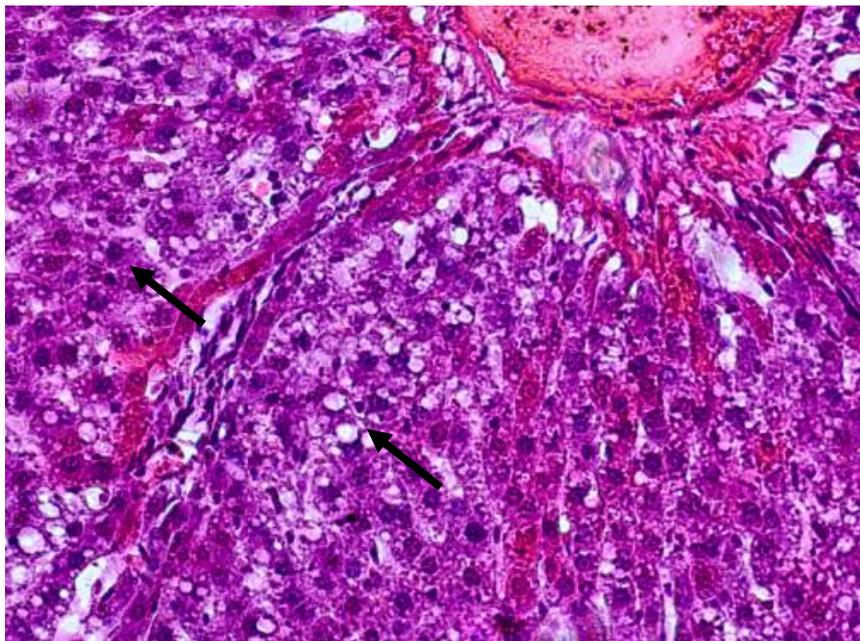
Fonte: Autora, 2014.

Figura 21 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DC (deficiente em colina AIN 93). Aumento 20x. Seta: Desorganização dos cordões hepáticos em todo o corte, esteatose hepática e indícios de fibrose.



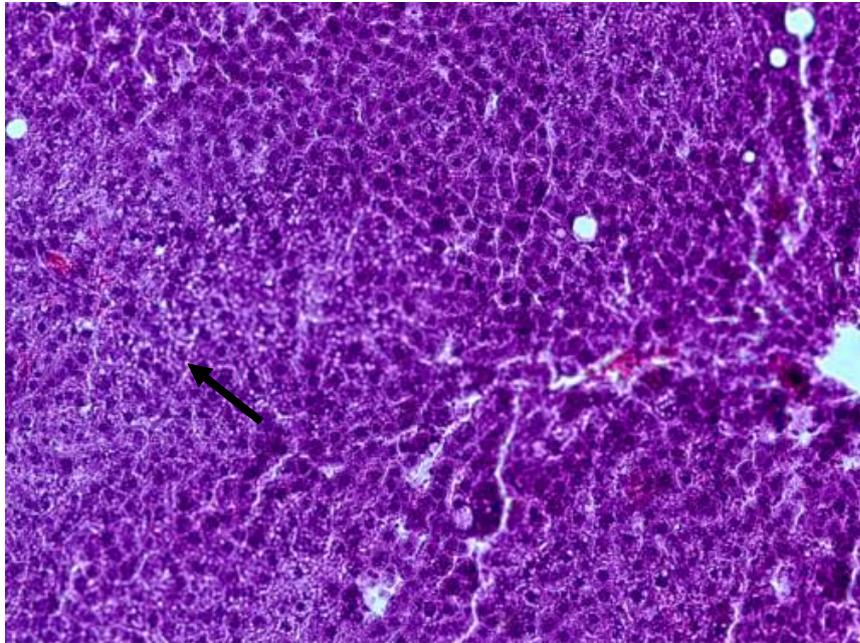
Fonte: Autora, 2014.

Figura 22 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DC (deficiente em colina AIN 93). Aumento 40x. Seta da direita: Hepatócitos balonizados; seta da esquerda: esteatose macro e microvesicular.



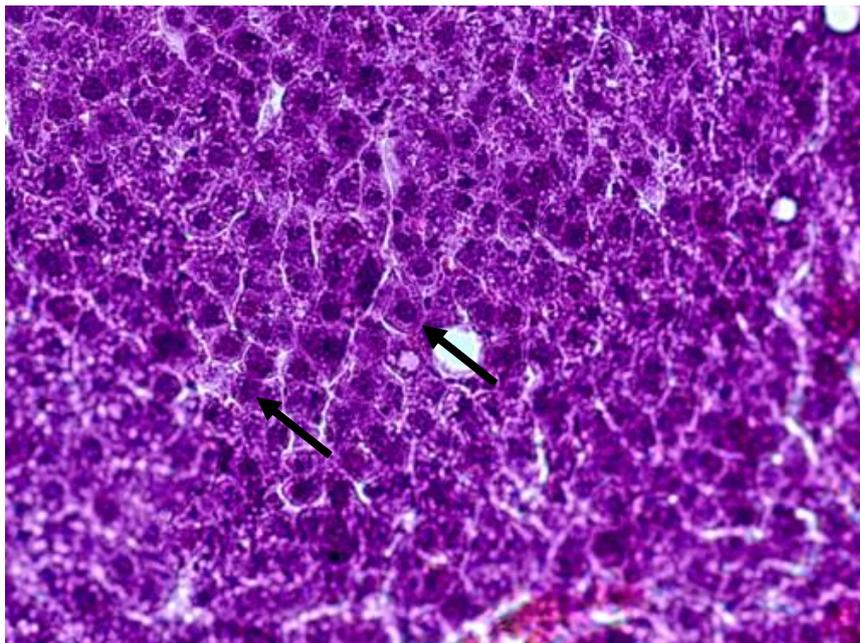
Fonte: Autora, 2014.

Figura 23 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DCC (deficiente em colina e cistina AIN 93). Aumento 20x. Seta: Desorganização dos hepatócitos, aumento nuclear, esteatose microvesicular.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 24 - Corte histológico do fígado corado pelo método HE, do grupo DCC (deficiente em colina e cistina AIN 93). Aumento 30x. Seta da direita: Núcleo aumentado de tamanho; seta da esquerda: desestruturação nuclear, corpúsculos de *Mallory*.



Fonte: Autora, 2014.

O uso de modelos experimentais DC e DCM para a indução de EH é bem conhecido. Como exemplo, tem-se o trabalho de Veteläinen et al. (2007), onde ratos alimentados com a dieta DCM por 7 semanas desenvolveram perda de peso, alto grau de esteatose, aumento do EO (avaliado por TBARS e glutathiona), diminuição da capacidade antioxidante e progressão para EHNA (inflamação mediada por CK e fibrogênese). Em contraste, os ratos alimentados com dieta DC desenvolveram esteatose não complicada e características similares à SM humana como resistência à insulina, dislipidemia e obesidade, representando dois modelos patogênicos de DFGNA diferentes. Desta forma, a utilização dos modelos animais com DFGNA possibilita melhor entendimento da fisiopatologia da doença. O método de indução dietética utilizado no presente trabalho, com duas manipulações diferentes (DC e DCC), permitiu avaliar processos envolvidos na evolução da DFGNA de modo amplo, bem como diferenças e semelhanças na quantificação do EO, em momentos diferentes do processo fisiopatológico.

No trabalho de SANTOS et al. (2008), com animais alimentados com dieta AIN-93 ou dieta controle comercial, por 1 e 4 meses, um achado histológico importante apresentado principalmente pelos animais alimentados com a dieta AIN-93 foi a esteatose hepática, em 90% dos animais do grupo AIN-93 1 mês e 100% dos animais AIN-93 4 meses, contra, apenas, 20,0% dos animais do grupo controle comercial 4 meses. Os animais do grupo controle comercial 1 mês não apresentaram EH. Além disso, os animais do grupo AIN-93 1 mês apresentaram 75% dos casos graves de EH observados, graus 4 e 5, de acordo com ATAÍDE et al. (2009), enquanto que aqueles do grupo AIN-93 4 meses, 25,0%, contra nenhum caso grave nos animais alimentados com a dieta comercial controle. Por isso, o estudo do tipo agudo (30 dias) foi o de escolha para o presente experimento.

Além disso, a escolha da dieta deficiente em fatores lipotróficos foi feita, por ser este modelo considerado o principal no estudo da esteato-hepatite, a qual foi primeiramente caracterizada pelo consumo contínuo e excessivo de álcool (NEWBERNE et al., 1982). Diversos estudos demonstram que a ingestão crônica de etanol provoca esgotamento de colina, ácido fólico e metionina, devido à interação do álcool com o metabolismo destes nutrientes (TRIMBLE et al., 1993; BARAK; BECKENHAUER, 1988), deficiência esta semelhante à encontrada na indução por

dietas DC e/ou DCM. Deste modo, dietas deficientes em compostos lipotróficos foram desenvolvidas como um modelo de DFGNA em roedores, reproduzindo as principais características de esteato-hepatite em humanos (MARCOLIN et al., 2011).

Outro ponto abordado pelo modelo experimental foi o efeito da ingestão de diferentes níveis de AGEs no surgimento e/ou agravamento do quadro de DFGNA. No estudo de Shangari et al (2007) com “dieta termolizada”, que compreende a formulação padrão AIN-93G (118 °C por 3 a 5 min, em autoclave), submetida a um tratamento adicional (122 °C por 30 min, em autoclave), observou-se que os animais tornavam-se deficientes em tiamina, com diminuição da atividade da transcetolase, dos níveis de glutathiona no soro e aumento significativo de proteínas carboniladas no soro, fígado e cólon. Por isso, foram administrados aos animais, dietas em pó ou peletes. O aquecimento da dieta é também responsável pela maior formação de AGEs no alimento (TAN et al., 2010; SHANGARI et al., 2007).

5.2 Peso dos animais e ingestão dietética

Para a avaliação do processo de evolução dos animais submetidos a diferentes modelos dietéticos durante o período do experimento, o peso e a ingestão dietética foram coletados semanalmente. A ingestão alimentar dos animais não diferiu entre os grupos até a terceira semana do experimento ($p \geq 0,05$). Na quarta semana, os animais das dietas em peletes ingeriram maior quantidade de dieta que os animais das dietas em pó ($p < 0,05$), pois, como esperado, animais roedores preferem dietas sólidas. Os animais do grupo Pp ingeriram menos dieta que os dos grupos DCp e DCCp ($p < 0,05$), no entanto, apesar da diferença na ingestão alimentar, o peso corporal final dos animais não diferiu entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Em relação à avaliação de peso semanal, na segunda semana, os animais do grupo Ppel apresentaram maior peso que os animais dos demais grupos ($p < 0,05$). Nas semanas seguintes, 3ª e 4ª, ocorreu uma igualdade no peso intra grupo e os animais dos grupos peletes apresentaram maior peso que aqueles dos grupos em pó ($p < 0,05$), devido à maior ingestão alimentar destes grupos, como observado anteriormente. Uma observação importante foi que os animais dos grupos deficientes, DCp e DCCp; DCpel e DCCpel, não diferiram de peso em relação aos seus padrões Pp e Ppel, respectivamente ($p \geq 0,05$). Esta foi a

observação mais importante neste ponto, pois, foi demonstrado que, apesar da deficiência dietética e do desenvolvimento de alterações hepáticas, alterações de peso não foram encontradas. É possível que o período experimental (30 dias) tenha sido insuficiente para a instalação da perda de peso e/ou desnutrição, comum em modelos animais DCC. Os pesos absoluto e relativo do fígado (peso do fígado/peso corporal) dos animais não diferiram ($p \geq 0,05$; Tabela 5).

Os diversos estudos com modelos DCM produzem desnutrição em seus animais (Tabela 9, pag. 122), (MARCOLIN et al., 2011; ZAMIN et al., 2009; VETELÄINEN et al., 2007). Diferentemente destes achados, os animais, DC ou DCC, não apresentaram este quadro. Não houve diferença de peso entre os grupos deficientes e o controle. Possivelmente o tipo de estudo, agudo, foi insuficiente para demonstrar esses processos, pois nos trabalhos anteriormente citados, o período de experimentação foi superior ao nosso. Além disso, a composição química destas dietas para uso em animais, não são descritas de forma detalhada, dificultando processos comparativos.

Em alguns trabalhos experimentais, os animais podem não apresentar desnutrição como resposta às dietas DC, DCM ou DCC pois, apesar de deficientes em metionina e colina, as dietas podem apresentar concentrações elevadas de sacarose e gordura (40% de sacarose e 10% de gordura) em sua composição. Isto resulta no decréscimo da síntese e liberação de VLDL e na intensificação do processo de lipogênese, com piora do quadro de DFGNA (HEBBARD; GEORGE, 2011). Estas alterações de composição não foram incluídas neste trabalho, pois o intuito não foi utilizar um modelo experimental que pudesse induzir também a obesidade e componentes outros da síndrome metabólica, mas que pudesse proporcionar um estudo amplo da EH/EHNA independente destes fatores. O interesse do grupo consistiu em observar o metabolismo hepático apenas na deficiência de fatores lipotróficos para possível associação com outras doenças hepáticas, além da SM, como a doença hepática alcoólica ou a desnutrição grave, onde a deficiência desses fatores é comum.

Além disso, a escolha do modelo DCM ou DCC não causa resistência à insulina, especificamente por evitar a hiperglicemia, uma vez que isto resultaria num aumento da produção de AGEs endógenos, através da glicação de proteínas e

acúmulo de AGEs em tecidos do corpo, confundindo os efeitos da exposição aos AGEs dietéticos (LEUNG et al., 2013).

Tabela 5 - Peso corporal final (PCF), peso absoluto do fígado (PAF) e peso relativo do fígado (PRF) nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.

VARIÁVEIS	GRUPOS (n=10)						
	Cont	Pp	Ppel	DCp	DCpel	DCCp	DCCpel
PCF (g)	170,25±11,46 ^a	176,80±11,34 ^a	189,97±18,49 ^a	177,08±22,61 ^a	185,87±18,00 ^a	175,92±16,90 ^a	175,92±16,90 ^a
PAF (g)	6,69±0,36 ^a	7,38±0,99 ^a	7,64±1,05 ^a	7,48±0,94 ^a	7,64±0,88 ^a	7,41±0,69 ^a	7,41±0,69 ^a
PRF	0,03±0,002 ^a	0,04±0,004 ^a	0,04±0,002 ^a	0,04±0,003 ^a	0,04±0,003 ^a	0,04±0,002 ^a	0,04±0,002 ^a

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

DFGNA- Doença do fígado gorduroso não alcoólica

Cont- Controle (dieta comercial)

Pp- Padrão pó, Ppel- Padrão peletizada, DCp- Deficiente em colina pó, DCpel- Deficiente em colina peletizada, DCCp- Deficiente em colina e cistina pó, DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletizada (formuladas a partir da dieta padrão do *American Institute of Nutrition* na versão 93)

5.3 Parâmetros bioquímicos

A avaliação bioquímica representa um meio de avaliação indireta do metabolismo hepático e corporal. Em relação às variáveis mensuradas neste estudo (Tabela 6), a glicemia observada nos animais do grupo DCCp foi maior que a dos animais dos grupos Cont, DCpel e DCCpel ($p < 0,05$) e similar aos demais grupos ($p \geq 0,05$). A glicemia não diferiu dentro dos grupos submetidos às dietas pó ou peletes. Os níveis séricos de triacilgliceróis e VLDLc foram menores nos animais do grupo Cont em relação aos animais dos grupos Pp, Ppel, DCp e DCpel ($p < 0,05$), os quais apresentaram esteatose hepática. Para os animais do grupo Pp observaram-se níveis maiores em relação aos animais dos grupos Cont e DCCp ($p < 0,05$) e semelhantes aos demais ($p \geq 0,05$). Os demais parâmetros do lipidograma não diferiram ($p \geq 0,05$).

Tabela 6 - Variáveis bioquímicas séricas nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.

VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	GRUPOS (n=10)						
	Cont	Pp	Ppel	DCp	DCpel	DCCp	DCCpel
Glicemia (mg/dL)	147,50±27,20 ^a	168,32 ± 45,73 ^{ab}	163,68 ± 32,43 ^{ab}	192,24 ± 36,35 ^{ab}	140,80 ± 36,81 ^a	199,48 ± 41,76 ^b	149,72 ± 18,89 ^a
Triacilgliceróis (mg/dL)	52,50±7,93 ^a	127,90 ± 54,88 ^b	114,50 ± 44,08 ^{bc}	120,00 ± 56,08 ^{bc}	122,12 ± 36,81 ^{bc}	73,40 ± 22,84 ^{ac}	91,80 ± 32,94 ^{abc}
Colesterol total (mg/dL)	102,50±29,70 ^a	109,20 ± 52,16 ^a	104,30 ± 53,25 ^a	105,44 ± 20,70 ^a	107,37 ± 32,14 ^a	88,40 ± 15,24 ^a	85,70 ± 19,44 ^a
LDL-c (mg/dL)	52,60±21,54 ^a	44,02 ± 32,52 ^a	44,40 ± 40,26 ^a	41,88 ± 21,25 ^a	47,07 ± 22,57 ^a	39,32 ± 11,65 ^a	36,14 ± 14,82 ^a
HDL-c (mg/dL)	39,40±7,42 ^a	39,60 ± 14,12 ^a	37,00 ± 10,15 ^a	39,55 ± 8,61 ^a	35,87 ± 7,71 ^a	34,40 ± 7,48 ^a	31,20 ± 7,09 ^a
LDL-c/HDL-c	1,29±0,27 ^a	1,08 ± 0,56 ^a	1,13 ± 0,60	1,03 ± 0,44 ^a	1,28 ± 0,49 ^a	1,16 ± 0,36 ^a	1,18 ± 0,57 ^a
VLDL-c (mg/dL)	10,50±1,58 ^a	25,58 ± 10,97 ^b	22,90 ± 8,81 ^{bc}	23,79 ± 11,21 ^{bc}	24,08 ± 7,36 ^{bc}	14,68 ± 4,57 ^{ac}	18,36 ± 6,58 ^{abc}
Proteínas totais (g/dL)	5,50±0,26 ^a	5,38 ± 0,28 ^a	5,67 ± 1,33 ^a	5,45 ± 0,36 ^a	5,42 ± 0,41 ^a	5,35 ± 0,53 ^a	5,29 ± 0,25 ^a
Albumina (g/dL)	3,39±0,14 ^a	2,97 ± 0,21 ^b	3,05 ± 0,32 ^{ab}	3,01 ± 0,24 ^b	2,96 ± 0,24 ^b	2,98 ± 0,36 ^b	2,90 ± 0,37 ^b
Globulina (g/dL)	2,11±0,21 ^a	2,41 ± 0,43 ^a	2,63 ± 1,40 ^a	2,42 ± 0,51 ^a	2,43 ± 0,44 ^a	2,28 ± 0,69 ^a	2,39 ± 0,54 ^a
ALT (U/L)	55,50±5,01 ^a	31,27 ± 3,66 ^b	29,74 ± 6,11 ^b	31,67 ± 4,44 ^b	35,58 ± 5,95 ^b	31,65 ± 6,14 ^b	33,05 ± 7,35 ^b
AST (U/L)	167,60±22,65 ^{ab}	149,95 ± 42,38 ^a	136,53 ± 29,54 ^a	171,27 ± 71,98 ^{ab}	207,10 ± 84,33 ^b	163,71± 44,74 ^{ab}	175,84 ± 74,92 ^{ab}
AST/ALT	3,03±0,45 ^a	4,85 ± 1,48 ^b	4,61±0,62 ^b	5,39 ± 2,13 ^b	5,67 ± 1,64 ^b	5,15 ± 0,80 ^b	5,20 ± 1,22 ^b
ALP (U/L)	430,50±73,84 ^a	333,30 ± 131,33 ^a	292,80 ± 86,00 ^a	323,11 ± 77,71 ^a	337,62 ± 126,74 ^a	360,70 ± 106,42 ^a	351,70 ± 183,48 ^a

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

Cont- Controle (dieta comercial), Pp- Padrão pó, Ppel- Padrão peletizada, DCp- Deficiente em colina pó, DCpel- Deficiente em colina peletizada, DCCp- Deficiente em colina e cistina pó, DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletizada (Formuladas a partir da dieta padrão do American Institute of Nutrition na versão 93). HDLc- high density lipoprotein cholesterol, VLDLc- very low density lipoprotein cholesterol, LDLc- low density lipoprotein cholesterol, AST- aspartato aminotransferase, ALT- alanina aminotransferase, ALP- fosfatase alcalina.

A glicemia no grupo DCCp mais elevada que nos grupos DCpel, DCCpel e Cont (Tabela 6) foi semelhante ao encontrado para dietas DCM por Marcolin et al. (2011), Wu et al. (2010), Soon et al. (2010). O aumento na glicemia é observado durante o desenvolvimento da doença hepática (Figura 2, p. 33). Nos quadros de EH, o fígado trabalha com o objetivo de manter a homeostase central, ou seja, do próprio órgão e sistêmica. Uma das formas de diminuir o contínuo acúmulo de gordura neste tecido é a exportação de triglicerídeos para o sangue, incorporado em partículas de VLDL. Na corrente sanguínea, ocorre competição entre lipídios e glicose por incorporação e oxidação nos tecidos periféricos, ocasionando hiperglicemia e resistência à insulina (ANSTEE; GOLDIN, 2006). Para o grupo DCCp, a exportação de lipídios via VLDL manteve-se, mesmo de forma deficiente, acompanhado de competição como substrato energético oxidável com conseqüente hiperglicemia nestes animais. Estudos com evidência de que os níveis de glicose encontram-se baixos, em animais EHNA, sugeriram exaustão hepática (com interrupção da gliconeogênese). Este fato pode ser explicado por diferenças na composição entre as dietas DCM ou DCC.

O acúmulo de gordura no fígado resulta da deficiência da colina para síntese da porção fosfatidilcolina em partículas de VLDL. Na ausência de colina, VLDL não é secretado e TAG se acumula no citoplasma do fígado (Figura 13, p. 66) (KANURI; BERGHEIM, 2013). As maiores concentrações de TAG e VLDL nos grupos Padrão e DC, que no grupo controle (Cont.), podem refletir o esforço metabólico hepático, em estágios diferentes da esteatose, para manter a homeostase do meio, a partir da exportação de lipídios do fígado para a corrente sanguínea. Resultados semelhantes foram observados para grupos EHNA nos estudos de MARCOLIN et al. (2011); SOON et al. (2010); VETELÄINEN et al. (2007).

Diante da presença de esteatose hepática, a avaliação funcional do órgão precisa ser realizada. Os métodos mais comuns são a mensuração dos níveis séricos de proteínas totais e suas frações. Dentre estes, os níveis séricos de albumina dos animais do grupo Cont. foram maiores que os apresentados pelos animais dos demais grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo Ppel ($p \geq 0,05$). Isto se explica devido ao grupo controle não ter apresentado danos teciduais, preservando

sua função na síntese desta proteína. Não foi observada diferença nos níveis séricos de globulina e proteínas totais entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Alterações específicas dos níveis de albumina (Tabela 6) reforçaram nossos achados quanto às disfunções do metabolismo lipídico e EH. Foram encontradas concentrações mais baixas de albumina em todos animais que receberam dieta AIN (com ou sem deficiência) em relação ao grupo controle. Uma das funções da albumina sérica é o transporte de ácidos graxos do fígado para o sangue. Todos os animais AIN apresentaram algum grau de dano hepático. Desta forma, a necessidade por albumina estaria aumentada, com conseqüente diminuição de seus níveis séricos. Outro ponto, é o processo de inflamação e síntese de proteínas de fase aguda no dano hepático com inflamação, o que também contribui para a diminuição de albumina

Entre as provas bioquímicas de lesão hepatocelular que mensuram a presença de compostos intracelulares no espaço extracelular estão as determinações de transaminases AST e ALT, indicadores da integridade celular, e ALP e γ -GT, indicadores de reação ou sobrecarga celular, valiosos no diagnóstico da doença hepatobiliar (COLICHON et al., 2001). A ALT é encontrada, principalmente, no citoplasma, enquanto a AST está presente no citoplasma e mitocôndria do hepatócito. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e no prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, e em lesões graves, há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (SILVA et al., 2008; MOTA, 2003).

Na EH, as provas de lesão hepática são variáveis podendo até mesmo não apresentar qualquer anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Os níveis de ALT podem se apresentar levemente aumentados (até 2 vezes) e os de AST, até 5 vezes, especialmente nos graus mais intensos de metamorfose gordurosa (RAVEL, 1997). No presente trabalho, todos os animais com dano hepático (dieta AIN 93 com ou sem modificações) apresentaram níveis de ALT inferiores ao grupo controle ($p < 0,05$). Em trabalhos com seres humanos, foi observado que os níveis de ALT podem flutuar entre a elevação e a normalidade em cerca de dois terços dos pacientes, durante a evolução da doença. Nos trabalhos de

Fracanzani et al. (2008) e Mofrad et al. (2003) demonstrou-se que a EHNA pode ser encontrada em indivíduos com valores de ALT normais. No estudo de Fracanzani et al. (2008), indivíduos com EHNA foram divididos em dois grupos de acordo com os níveis de ALT (com e sem alteração). A análise estatística demonstrou que não havia diferença entre os grupos. Dados como estes demonstram a inadequação deste marcador enzimático na predição da alteração hepática não alcóolica (FRACANZANI et al., 2008). Apesar disto, estas análises continuam sendo utilizadas na prática clínica por falta de outras, validadas pela comunidade científica.

Para a AST, o grupo DCpel apresentou níveis mais elevados que os grupos padrão(P) (Pp e Ppel) ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Marcolin et al. (2011) e Wu et al. (2010). A elevação da AST deve-se primariamente ao conteúdo citoplasmático, nas lesões hepáticas leves. Contudo, quando a lesão se agrava, a AST mitocondrial também é liberada. Portanto, altos níveis séricos de AST indicam alteração total do hepatócito. Sua determinação é útil no diagnóstico de doenças hepáticas crônicas em atividade (COLICHON et al., 2001). Os animais do grupo DCp apesar de não apresentarem diferença estatística como o grupo DCpel em relação aos padrões, demonstraram médias elevadas, o que pode ser uma tendência de que nos grupos DC, a lesão hepática pôde ser observada por este marcador. Outro ponto importante observado foi que os animais dos grupos DCC não apresentaram diferença estatística em relação aos demais grupos, porém isso não deve ser tomado como indício de ausência de dano tecidual pois contradiz os resultados histológicos. Como hipótese, estes animais apresentam um estágio de dano hepatocelular em que o aumento das transaminases não pôde mais ser visualizado no momento do sacrifício, ou seja, os picos sanguíneos para essas enzimas ocorreram em momento anterior à coleta de sangue ou seus níveis não seriam representativos da alteração histológica. Resultados semelhantes foram encontrados por Bitencourt et al. (2007), demonstrando que, em obesos graves, a DFGNA foi em geral assintomática e não apresentou alterações bioquímicas significativas (em especial para transaminases), apesar de um amplo espectro histológico com maior frequência de casos de esteato-hepatite com fibrose e cirrose.

Diante da dificuldade em avaliar a presença de DFGNA pelos marcadores de maior relação com o dano hepático alcóolico, tóxico ou viral, têm-se buscado,

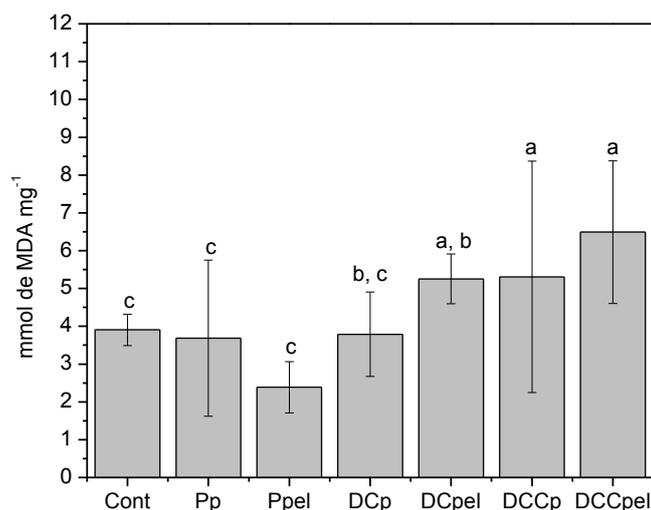
através de pesquisas experimentais e com seres humanos, outros meios que melhor interpretem a doença não alcoólica em seu estágio inicial, bem como a evolução da doença. Neste ponto, o estudo do estresse oxidativo apresenta-se com extrema relevância, pois sua relação com os mecanismos patológicos de diversas doenças já está bem estabelecido na literatura (SANTOS et al., 2013; FRACANZANI et al., 2008; BITENCOURT et al., 2007)

5.4 Perfil redox hepático

O estresse oxidativo (EO) é um importante fator contribuinte para a patogênese da doença hepática alcoólica e DFGNA. Vários estudos têm mostrado que a geração de EROs é a chave para a progressão da EH para esteato-hepatite. EROs são tóxicos para as células, uma vez que reagem com macromoléculas, desnaturam proteínas, inativam enzimas e causam danos ao DNA e RNA (Figura 1; p. 30) (LEUNG; NIETO, 2013). Diante desse contexto, a DFGNA caracteriza-se pela intensa produção de EROs, devido, principalmente, ao intenso acúmulo de lipídio hepático com maior vulnerabilidade ao estresse mitocondrial, peroxidação lipídica e deficiência crescente de fatores antioxidantes (Figura 12; p. 62), (SANTOS et al., 2013; KUMAR et al., 2013).

Na análise do perfil redox foram avaliados marcadores enzimáticos e não enzimáticos. Para as análises não enzimáticas, o valor relativo às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico avalia a peroxidação dos lipídios (PL) hepáticos. Neste estudo, para os grupos DCCp, DCCpel e DCpel, os níveis de PL foram iguais ($p \geq 0,05$) e estatisticamente maiores que o apresentado pelos animais dos grupos Cont, Pp e Ppel ($p < 0,05$), enquanto para os animais do grupos DCp, se igualaram ao seu correspondente DCpel e aos grupos Cont, Pp e Ppel ($p \geq 0,05$) (Figura 25).

Figura 25 - Concentração de TBARS em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. Cont- Controle; Pp- Padrão pó; Ppel- Padrão peletes; DCp- Deficiente em colina pó; DCpel- Deficiente em colina peletes; DCCp- deficiente em colina e cistina pó; DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm desvio padrão; dados foram analisados pelo teste de Tukey-HSD; $a \neq b \neq c$ ($p < 0,001$).



Fonte: Autora, 2014.

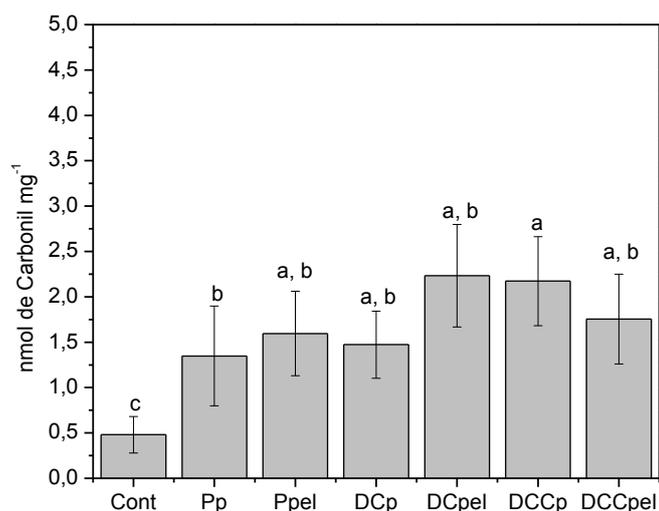
Maiores valores para a peroxidação lipídica nos grupos portadores de EH/EHNA também foram encontrados por Cui et al. (2013), Romero-Sarmiento et al. (2012), Marcolin et al. (2011), Veteläinen et al. (2007). Níveis aumentados de MDA, um produto da PL, estão envolvidos com a ativação de células hepáticas estreladas, fibrogênese e aumento da deposição de proteína na matriz extracelular. Quando a PL ocorre em nível nuclear, pode ocorrer dano ao DNA com indução da carcinogênese, juntamente com a disfunção da morte celular programada - apoptose (MARCOLIN et al., 2011; ROMERO-SARMIENTO et al., 2012).

Para a evolução da DFGNA, a peroxidação lipídica apresenta um papel de extrema relevância, o que pode ser demonstrado pelo trabalho de KUMAR et al. (2013) com pacientes portadores de DFGNA ou doença viral. Os pacientes com DFGNA apresentaram maiores níveis de MDA que aqueles com doença hepática viral. Neste estudo realizou-se, também, a dosagem de dienos conjugados, no entanto, mesmo sem diferença significativa, estes pacientes também apresentaram maiores níveis deste marcador.

Além de reações de dano direto às membranas celulares (e de organelas) ocasionado pela peroxidação lipídica, intermediários da lipoperoxidação podem servir como substrato para a síntese de outros compostos tóxicos ao meio. Um exemplo é a formação de AGEs pela reação entre compostos dicarbonílicos, como glioxal e MDA, provenientes da PL (Figura 5, p. 46), com um grupo amina oriundo de uma aminoácido (SANTOS et al., 2013). Neste trabalho, o aumento da glicemia não foi um achado comum entre os grupos esteatóticos, não sendo possível responsabilizar apenas a glicose pela formação de AGEs e sim sugerir que os intermediários lipídicos aumentados nos grupos deficientes, de acordo com a análise de TBARS, sejam os principais envolvidos no processo de carbonilação de proteínas e posterior formação de AGEs, em fígado gorduroso.

Para a análise de proteínas carboniladas, que avaliam o dano oxidativo proteico, foram encontradas concentrações deste marcador significativamente menores no grupo Cont em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo DCCp apresentou maiores níveis de carbonilação que o grupo Pp ($p < 0,05$) (Figura 26, p.108). Esses resultados demonstram que o dano oxidativo parece ser mais precoce nas proteínas, gerando carbonilação das mesmas, pois os níveis de proteínas carboniladas estão aumentados desde o grupo Padrão AIN-93 (P), que apresentou lesão hepatocelular discreta.

Figura 26 - Concentração de proteínas carboniladas em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. Cont - Controle; Pp - Padrão pó; Ppel - Padrão peletes; DCp - Deficiente em colina pó; DCpel - Deficiente em colina peletes; DCCp - deficiente em colina e cistina pó; DCCpel - Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm desvio padrão; dados foram analisados pelo teste de Tukey-HSD; $a \neq b \neq c$ ($p < 0,001$).



Fonte: Autora, 2014.

Outro ponto importante do trabalho e que podemos associar com o processo de carbonilação (uma forma de estresse oxidativo proteico), foram as menores concentrações de albumina plasmática nos animais alimentados com as dietas AIN-93 e, portanto, portadores de esteatose hepática com peroxidação lipídica associada, como mencionado anteriormente. De acordo com Baraibar; Ladouce; Friguet, (2013) e Guo et al. (2011), proteínas modificadas são encaminhadas para o desmonte, via proteossoma ou agregação tecidual como complexos insolúveis.

No trabalho de LORENZI et al. (2011) com avaliação de extrato hepático, o estímulo para carbonilação foi feito por meio de administração de glicolaldeído (GA) intravenosamente em diferentes concentrações. GA é um subproduto da glicosilação não enzimática e da mieloperoxidase em neutrófilos. Esta molécula é um aldeído de cadeia curta que reage principalmente com resíduos de lisina e arginina, além de resíduos de cisteína, que conduzem à formação de AGEs, tais como CML e GA-piridina (Figura 6, p. 48). No estudo, todas as doses de GA (10, 50 ou 100 mg/Kg de

peso) induziram à carbonilação de proteínas hepáticas. Em relação à mesma análise, neste trabalho, uma observação adicional refere-se à carbonilação de proteínas, ligada à presença da esteatose hepática, observada independentemente da intensidade da esteatose. Este dado demonstra a significância do processo de carbonilação proteica e futura formação de AGEs a partir de intermediários da peroxidação lipídica (Figura. 5, p. 46). Demonstra, adicionalmente, a importância de novos estudos para a melhor compreensão do impacto da formação de AGEs dependente da fonte de substrato para a evolução da doença.

Outro aspecto importante das reações de carbonilação é sua interação com compostos e enzimas antioxidantes, com decréscimo de sua atividade fisiológica. Como exemplo têm-se, o metilglioxal, outro aldeído, que também reage com a arginina e lisina, diminuindo a atividade da SOD, elevando os níveis de ânion superóxido e inibindo a atividade da catalase. Estes mecanismos diminuem a atividade antioxidante hepática, principalmente no estado de esteatose (LORENZI et al., 2011).

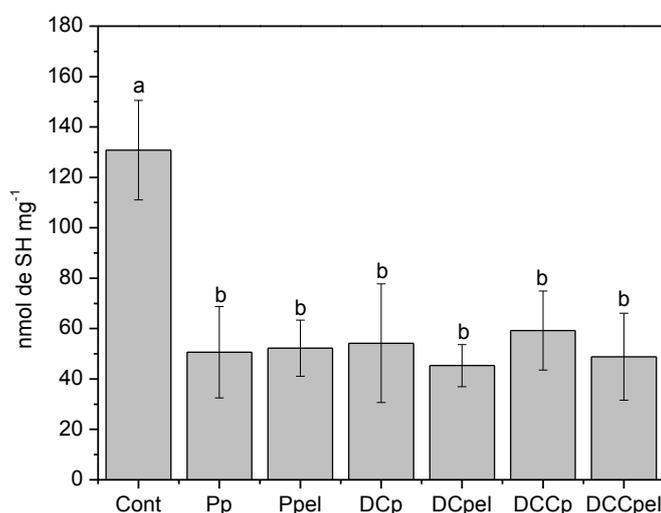
A carbonilação proteica, como descrito anteriormente, diminui a atividade dos componentes sulfurados com função antioxidante. Adicionalmente, para animais alimentados com dietas DC, DCM ou DCC, a capacidade antioxidante determinada por estes compostos é ainda mais prejudicada, pois este tipo de dieta reduz a síntese de glutatona (Figura 13, p. 66). Portanto, fígados gordurosos são mais sensíveis ao EO. A metionina é precursora da cisteína e dietas deficientes em fatores lipotróficos provocam depleção de glutatona hepática pela deficiência primária deste aminoácido. Metionina produz S-adenosilmetionina (SAME), um precursor da glutatona (via produção de homocisteína pela metionina) e doador de grupo metil para formação de colina. Há uma hipótese de que na deficiência de colina, ocorre uma preferência na utilização da SAME para a produção deste composto, diminuindo sua disponibilidade para formação da glutatona (Figura 13, p. 66) SAVOINI et al., 2010; CAVE et al., 2007).

A glutatona é encontrada tanto no citoplasma como nas mitocôndrias, pois é sintetizada no citosol e translocada para a mitocôndria, local responsável pela maior parte da produção de energia. Para a célula funcionar normalmente, é importante que quantidades de GSH na mitocôndria sejam suficientes, visto que a maior parte

dos EROs são formados nesta organela (LEUNG; NIETO, 2013; CHEN et al., 2013). Desta maneira, a análise de tiois totais possibilita avaliar a proteção antioxidante por grupos sulfurados, conhecidos como os primeiros antioxidantes hepáticos.

Neste estudo, as quantidades de glutathiona e outros compostos com grupos tiois estão reduzidas por se ofertar dietas DC e DCC, fato demonstrado indiretamente pela mensuração dos níveis de tiois totais no extrato hepático (Figura 27, p. 110). Em todos os grupos alimentados com as dietas AIN (deficientes ou não), os níveis de tiois totais se encontraram diminuídos em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), justificando sua exaustão/esgotamento frente ao estresse oxidativo apresentado por estes grupos, evidenciando-se ainda, que até mesmo a dieta AIN padrão (P) pode apresentar alguma deficiência em fatores lipotróficos.

Figura 27 - Concentração de tiois totais em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. Cont- Controle; Pp- Padrão pó; Ppel - Padrão peletes; DCp- Deficiente em colina pó; DCpel- Deficiente em colina peletes; DCCp- deficiente em colina e cistina pó; DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm desvio padrão; dados foram analisados pelo teste de Tukey-HSD; $a \neq b$ ($p < 0,001$).



Fonte: Autora, 2014.

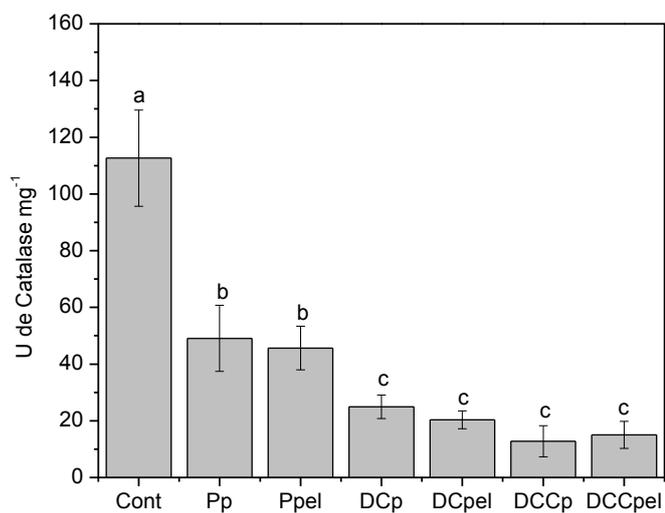
É importante ressaltar que o fígado é o maior órgão excretor de GSH para o plasma e a bile. Níveis de GSH estão diminuídos tanto na doença hepática alcoólica quanto gordurosa em modelos animais, sugerindo que a disponibilidade do

antioxidante endógeno ou o seu consumo para lidar com grandes quantidades de ERO está reduzida (LEUNG; NIETO, 2013).

Além da glutathione reduzida, os organismos biológicos apresentam também sistemas enzimáticos, cujo substrato é a glutathione (glutathione peroxidase e glutathione reductase). A glutathione reductase é responsável pela conversão da glutathione oxidada em reduzida, enquanto a glutathione peroxidase utiliza a glutathione reduzida para dismutar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, com oxidação da glutathione (Figura 9, p. 57). A última função também é realizada pela enzima catalase, sem uso de glutathione. Alguns estudos demonstram a importância desses sistemas em peroxissomos (catalase) e mitocôndrias (glutathione peroxidase) e a diminuição na atividade de ambos em estágios de EO avançado (LEUNG; NIETO, 2013; KOEK et al., 2011; JAESCHKE ; RAMACHANDRAN, 2011).

No estudo de Bakala et al. (2012), especula-se que o ciclo redox da glutathione é a maior fonte de proteção em presença de baixos níveis de peróxido de hidrogênio, enquanto a catalase torna-se mais significativa na citoproteção em EO severo, quando as concentrações de glutathione já foram depletadas. Neste trabalho, isto pôde ser evidenciado. Para tióis totais, todos os animais com esteatose apresentaram níveis destes compostos inferiores ao grupo controle, como descrito anteriormente. Já para a catalase, os grupos padrão Pp e Ppel (com esteatose leve), mantiveram níveis de catalase superiores aos deficientes (DC e DCC) ($p < 0,05$) e inferiores ao grupo controle ($p < 0,05$), demonstrando a exaustão inicial do sistema de glutathiones e manutenção parcial da atividade da catalase no estresse oxidativo (Figura 28).

Figura 28 - Atividade de catalase em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. Cont- Controle; Pp- Padrão pó; Ppel- Padrão peletes; DCp- Deficiente em colina pó; DCpel- Deficiente em colina peletes; DCCp- deficiente em colina e cistina pó; DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm desvio padrão; dados foram analisados por pelo teste de Tukey-HSD; $a \neq b \neq c$ ($p < 0,001$).

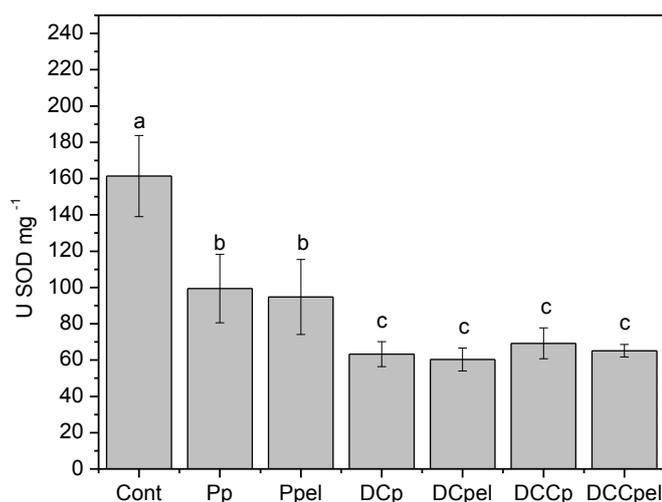


Fonte: Autora, 2014.

Outro importante ponto do estudo de Bakala et al. (2012) foi a glicação da catalase a partir do seu tratamento com a frutose (agente glicante) com consequente comprometimento de sua função e aumento do estresse oxidativo, principalmente em ratos idosos. Modelos patológicos podem simular, em estágio acelerado, a glicação e o EO, observados no envelhecimento.

Outra enzima componente do sistema antioxidante, a SOD, é responsável pela detoxificação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio. No excesso deste radical ou no processo de carbonilação da enzima, a função da SOD encontra-se prejudicada. Para a análise de SOD, os níveis desta enzima foram maiores para o grupo controle em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Já os grupos padrão (Pp e Ppel) apresentaram níveis de SOD mais elevados que os grupos DC e DCC (pó e pelete) ($p > 0,05$), que foram semelhantes entre si ($p \geq 0,05$) (Figura 29).

Figura 29 - Atividade de SOD em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. Cont- Controle; Pp- Padrão pó; Ppel- Padrão peletes; DCp- Deficiente em colina pó; DCpel- Deficiente em colina peletes; DCCp- deficiente em colina e cistina pó; DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm desvio padrão; dados foram analisados pelo teste de Tukey-HSD; $a \neq b \neq c$ ($p < 0,001$).



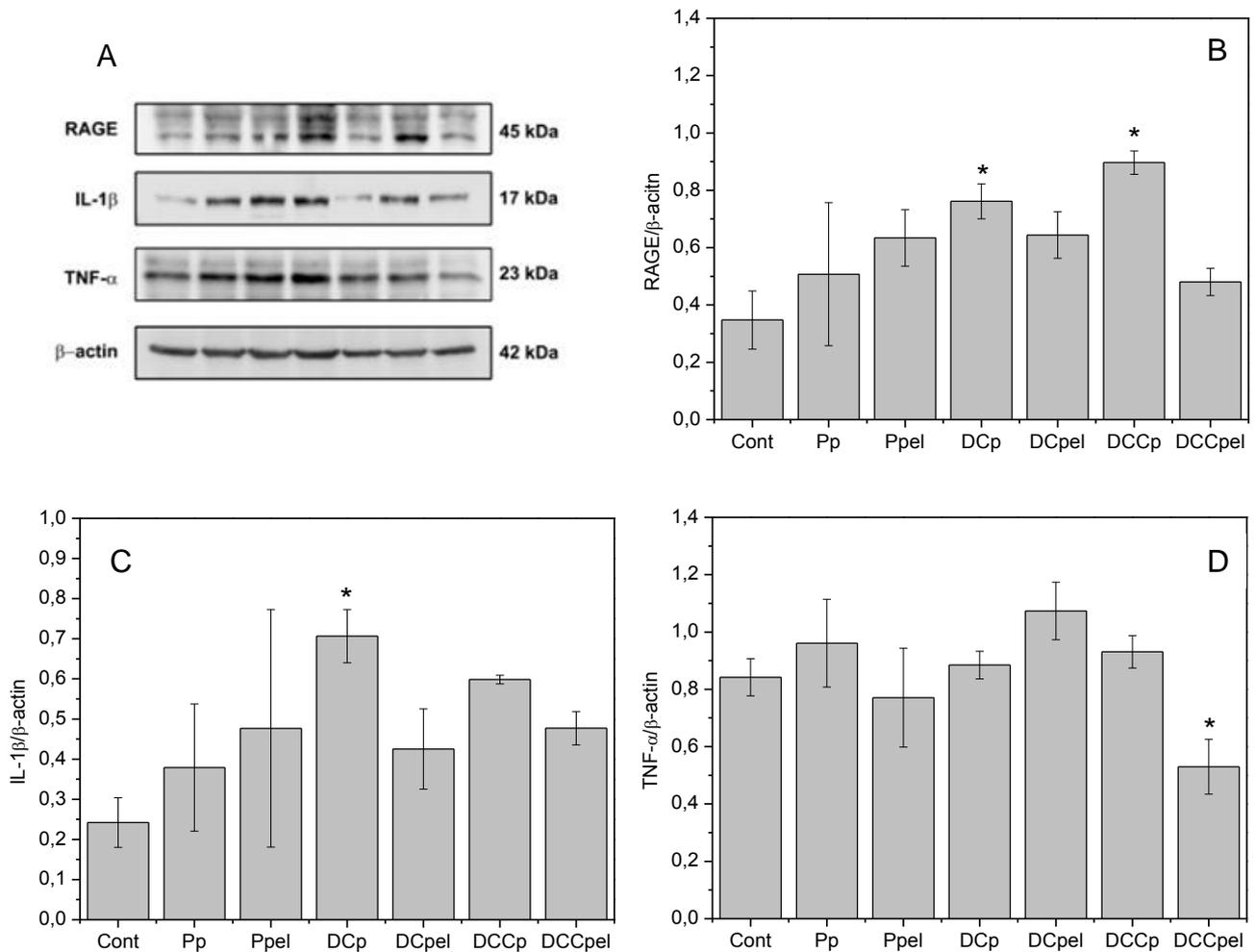
Fonte: Autora, 2014.

Estes resultados foram semelhantes ao trabalho de Romero-Sarmiento et al. (2012) em que o grupo com maior dano hepático apresentou menores níveis de SOD. Já no trabalho de Marcolin et al. (2011), não ocorreu diferença entre o grupo EHNA e o grupo controle, os autores sugerem exaustão da atividade da SOD. Resultados opostos para SOD podem ainda ser observados em alguns estudos, como exemplo, o trabalho de Kumar et al. (2013) com humanos, relata que a atividade aumentada da SOD observada em pacientes com EHNA poderia ser resultado de uma forma de adaptação ao maior estresse oxidativo observado neste grupo, demonstrando que os níveis da enzima podem variar de acordo com o desenho experimental do estudo, assim como outros marcadores do perfil redox.

5.5 Western Blot para RAGE, IL-1 β e TNF- α

Estudos que avaliaram ou analisaram a proteína RAGE na doença hepática, evidenciaram uma maior expressão deste receptor nos portadores ou em modelos animais desta patologia (GOODWIN et al. 2013; XIE et al, 2013; LEUN et al, 2013; BASTA et al, 2011). Neste trabalho, o immunoblot de RAGE detectou expressão mais elevada nos grupos deficientes alimentados com as dietas em pó (DCp e DCCp), em relação ao grupo controle (Cont) (controle interno a β -actina) (Figura 30B).

Figura 30 – Imunoblot com β -actin como controle interno e quantificação gráfica de IL-1 β , RAGE e TNF-alfa em extrato hepático nos diferentes modelos dietéticos. (A) expressão de RAGE, IL-1 β , TNF-alfa, β -actin; quantificação de (B) RAGE, (C) IL-1 β , (D) TNF-alfa. Cont- Controle; Pp- Padrão pó; Ppel- Padrão peletes; DCp- Deficiente em colina pó; DCpel- Deficiente em colina peletes; DCCp- deficiente em colina e cistina pó; DCCpel- Deficiente em colina e cistina peletes. Barras representam média \pm SEM; dados foram analisados por ANOVA one-way com teste post hoc de Duncan; *p <0,001 em relação ao controle.



Fonte: Autora, 2014.

A ativação de RAGE por AGEs, em processos patológicos, principalmente, é um dos responsáveis pela produção de EROs e várias respostas inflamatórias, como ativação de NF- κ B, TNF-alfa e interleucina 6 (IL-6) (Figura 12, p.62) (VALENCIA et al., 2004). Diversos estudos têm sugerido que a ativação das diferentes etapas de ação do RAGE é dependente do ligante e do tipo celular onde ele se encontra (HUTTUNEN, 2000). De acordo com o estudo de Jing et al. (2010), em ratos

alimentados com dietas ricas em gorduras, a expressão de RAGE está aumentada nas artérias hepáticas dos animais portadores de EHNA. Segundo os autores, estes achados sugerem que a interação AGEs/RAGE está envolvida na patogênese da doença.

No estudo de Leung et al. (2013), com animais alimentados com dietas DCM aquecidas ou não, por 12 semanas, estudo crônico, demonstrou-se que dietas ricas em AGEs exacerbam a injúria hepática e fibrose na doença experimental. Na parte *in vitro* do experimento, com células hepáticas estreladas, foi visto que a utilização de bloqueador de RAGE diminuiu a atividade fibrogênica desta célula. Outro ponto importante do estudo foi que o aumento dos AGEs dietéticos não contribuíram para danos na bioquímica ou histologia hepática em animais sem a doença, sugerindo que os AGEs podem atuar como cofatores para o aumento da injúria em tecidos já doentes.

No presente trabalho, a maior expressão do RAGE apenas nos animais deficientes alimentados com a dieta em pó (DCp, DCCp), ainda necessita de uma resposta. Para as análises do perfil redox e análise histológica, os grupos alimentados com as dietas deficientes (pó e peletes) apresentaram perfis de dano semelhantes, o que não justificaria tal expressão. No entanto, retornando a análise do perfil bioquímico, foi visto que a glicemia dos animais do grupo DCCp foi mais elevada que para os animais dos grupos controle e deficientes em peletes (DCp e DCCpel) e, que a média do grupo DCp para esta análise, apesar de não ter apresentado diferença estatística, também foi mais elevada. Desta forma, a hiperglicemia destes animais poderia ter contribuído para a maior expressão de RAGE nestes grupos. Tal observação demonstra a importância dos níveis glicêmicos alterados para a formação de AGEs, os quais ocasionam, a partir de interação AGEs/RAGE, EO e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. Além disso, foi visto que os intermediários da peroxidação lipídica, entre outros ligantes para RAGE, não foram suficientes, neste estudo, para aumentar a expressão do receptor no hepatócito, apesar do dano tecidual observado pela histologia e pelos marcadores de EO. Isso não quer dizer que estes ligantes não tenham importância no agravo da doença hepática, seu papel seria secundário diante do aumento na concentração de glicose, o substrato primário para a produção de AGEs.

O papel da interação AGEs/RAGE como indutor do processo inflamatório (Figura. 12, pag. 62) foi avaliado a partir da quantificação de IL-1 β e TNF- α em extrato hepático. Para a IL-1 β , implicada no acúmulo de lípidos, morte celular e fibrinogênese dos hepatócitos (OLTEANUA et al, 2014; VONGHIA et al, 2013), observou-se sua maior expressão nos animais do grupo DCp, semelhante ao encontrado na expressão de RAGE (Figura 30C). Tendência inversa, em relação ao RAGE e IL-1 β , foram visualizados para TNF- α , com menor expressão nos animais do grupo DCCpel.

No trabalho de Miura et al (2010) com modelo animal de EHNA por dieta DCM foi observado que maior quantidade de IL-1 β , junto ao acúmulo de gordura hepática, ocasionou inativação nuclear do factor- κ B resultando em inflamação e morte celular e, fibrose hepática (através da ativação de células hepáticas estreladas). No mesmo estudo, também foi observado que os ratos sem receptor para esta interleucina apresentam atenuação da esteatose, inflamação e fibrose hepática. Dados semelhantes para IL-1 β foram demonstrados em nosso estudo para os animais apresentando intenso acúmulo de gordura hepática ou dano celular. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão quanto ao não aumento desta interleucina e do RAGE em ratos alimentados com as dietas deficientes em peletes.

A patogênese da EHNA envolve várias etapas incluindo lipotoxicidade, endotoxinas intestinais, sinais do sistema inato como receptores toll like (TLRs), citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo do retículo endoplasmático. Citocinas inflamatórias como TNF α , IL-6 e IL-1, podem ser produzidas por células de Kupffer, que também contribuem para o aumento da lesão hepática através da síntese de fatores do complemento e de EROs (OLTEANUA et al, 2014; VONGHIA et al, 2013; ROLO et al, 2011).

O TNF- α contribui para a inflamação, resistência à insulina e esteatose hepática (por modulação da atividade da SREBP). O TNF- α pode ser produzido por outras células, além da CK, como por exemplo, células do tecido adiposo e hepatócitos (Santos et al., 2013). Este fator contribui significativamente para a disfunção celular por promover a produção de EROs (por provocar disfunção da

cadeia de transporte de elétrons); induzir a morte celular por meio da ativação da caspase 8 e ativar a cascata apoptótica no citosol (ROLO et al, 2011).

Apesar dos resultados contraditórios do estudo para TNF- α , um crescente corpo de evidências suporta um papel central para o TNF- α e outras citocinas inflamatórias na progressão da EH para EHNA, com correlação entre os níveis circulantes destas citocinas e a gravidade da esteatose, necroinflamação e fibrose (ROLO et al, 2011).

O estudo de correlação de Pearson entre a expressão de de RAGE, IL-1 β , TNF- α e o perfil redox hepático e; do perfil redox hepático entre a bioquímica sérica nos diferentes modelos dietéticos, encontra-se sumarizado nas Tabelas 7 e 8 respectivamente.

Tabela 7 - Estudo de correlação de Pearson entre a expressão de RAGE, IL-1 β , TNF- α e o perfil redox hepático em diferentes modelos dietéticos de DFGNA.

	TBARS CONT	Carbonil CONT	Tiois Totais CONT	Catalase CONT	SOD CONT
RAGE					
r					-0,999
p					0,034
IL-1 β					
r	1,000				
p	0,015				
TNF-α					
r	0,098				
p	0,036				
	TBARS Pp	Carbonil Pp	Tiois Totais Pp	Catalase Pp	SOD Pp
TNF-α					
r					0,998
p					0,038
	TBARS Ppel	Carbonil Ppel	Tiois Totais Ppel	Catalase Ppel	SOD Ppel
TNF-α					
r			-0,999		
p			0,026		
	TBARS	Carbonil	Tiois Totais	Catalase	SOD

	DCp	DCp	DCp	DCp	DCp
RAGE					
r			-0,999		
p			0,026		
TNF-α					
r			1,000		
p			0,005		
	TBARS DCpel	Carbonil DCpel	Tiois Totais DCpel	Catalase DCpel	SOD DCpel
IL-1 β					
r			0,999		
p			0,022		
	TBARS DCCp	Carbonil DCCp	Tiois Totais DCCp	Catalase DCpel	SOD DCpel
TNF-α					
r				-0,999	
p				0,034	
IL-1 β					
r		-0,998			
p		0,042			

Fonte: Autora, 2014.

Tabela 8 – Estudo de correlação de Pearson entre o perfil redox hepático e a bioquímica sérica nos diferentes modelos dietéticos de DFGNA.

	TBARS Pp	Carbonil Pp	Tiois Totais Pp	Catalase Pp	SOD Pp
Glicemia Pp				+0,719	
r				0,019	
p					
	TBARS Ppel	Carbonil Ppel	Tiois Totais Ppel	Catalase Ppel	SOD Ppel
Glicemia Ppel					
r	-0,824				
p	0,044				
ALP Ppel					
r	-0,828				
p	0,042				
	TBARS DCp	Carbonil DCp	Tiois Totais DCp	Catalase DCp	SOD DCp
ALT DCp					
r				-0,880	
p				0,021	
AST DCp					
r				0,835	
p				0,038	
	TBARS DCpel	Carbonil DCpel	Tiois Totais DCpel	Catalase DCpel	SOD DCpel
Albumina DCpel					
r	-0,905				
p	0,002				
Globulina DCpel					
r	0,768				
p	0,026				
ALT DCpel					
r	-0,970				
p	0,000				
AST DCpel					
r	-0,746				
p	0,033				
ALP DCpel					
r	-0,741				
p	0,035				

	TBARS DCCp	Carbonil DCCp	Tiois Totais DCCp	Catalase DCCp	SOD DCCp
Glicemia DCCp					
r	+0,763	+0,741			
p	0,046	0,036			
Triglicerídeos DCCpel					
r	-0,813				
p	0,049				
VLDL-col DCCpel					
r	-0,813				
p	0,049				
Glicemia DCCpel					
r			-0,677	-0,681	
p			0,032	0,030	
HDL-col DCCpel					
r			+0,701		
p			0,024		
ALP DCCpel					
r			+0,753		
p			0,012		

A tabela 9 sumariza resultados da literatura de estudos, semelhantes ao nosso, com experimentação animal utilizados na discussão deste material. Como critério de inclusão utilizou-se o uso de dietas AIN-93 (aquecidas ou não) ou outras formulações que ocasionassem a esteatose hepática. Estudos com seres humanos não foram utilizados.

Tabela 9- Estudos de experimentação animal relacionados ao dano do tecido hepático e à DFGNA registrados na literatura, com desenho experimental semelhante ao do presente trabalho.

Autoria/ Ano	Dieta	Idade dos animais/ Período de estudo	Presença de EH/EHNA (histologia)	Biomarcadores	Achados Principais
LEUNG et al. (2013)	Controle- com e sem aquecimento DCM- com e sem aquecimento	- / 12 semanas	Sim	Bioquímica sérica AGEs HNE EHNA (CD43, IL-6, TNF-alfa) Fibrose (α-SMA, CTGF, COL1A, picosirius)	DCM aquecida: ↑ Lipídios séricos ↑ AGEs ↑ HNE ↑ Marcadores de EHNA ↑ Marcadores de fibrose
ROMERO-SARMIENTO (2012)	Controle Controle + 30% de sacarose na água de beber e óleo de soja Controle + 30% de sacarose na água de beber e ácido linoleico conjugado (CLA)	21 dias/ 17 semanas	Sim	Bioquímica sérica MDA SOD GPx Catalase	Dieta óleo de soja: ↑ Colesterol, triglicerídeos e ALT ↑ MDA ↓ GPx, SOD, catalase
MARCOLIN et al. (2011)	Controle DCM	8 semanas/ 2 semanas	Sim	Bioquímica sérica TBARS SOD Catalase GSH total	Controle vs. DCM: ↑ AST, ALT, ALP ↓ Glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL-col, VLDL; ↑ TBARS, GSH total; Perda de peso

LORENZI et al. (2011)	Controle	Animais escolhidos de acordo com o peso (280-320 g) Administrou-se GA em diferentes doses.	Não	CML Proteínas carboniladas TBARS Tiois reduzidos SOD Catalase Glioalase I	↑ CML ↑ Proteínas carboniladas, TBARS ↓ Tiois reduzidos ↓ SOD, catalase e glioalase I
LUCENA et al. (2010)	AIN 93G AIN 93G + de óleo de soja AIN 93G + trienantina	Recém desmamados/ 6 semanas	Sim	Bioquímica sérica	Ausência de diferença significativa na bioquímica sérica. Dieta AIN 93G + trienantina não provoca efeitos metabólicos adversos.
WU et al. (2010)	Controle Dieta rica em gordura (DRG) Dieta rica em gordura+pentoxifilina (DPTX)	Animais escolhidos de acordo com o peso (110-130 g) /16 semanas	Sim	Bioquímica sérica Expressão de AGEs e RAGE RT-PCR	DRG: ↑ ALT, AST, glicose, colesterol,total, LDL-col, insulina e HOMA-IR ↑ AGEs e RAGE DPTX: ↓ AST e glucose ↓ AGEs e RAGE
SOON et al. (2010)	Controle DCM	-/ 4 - 21 dias	Sim	Bioquímica sérica Triglicerídeos hepáticos; Marcadores de resposta ao estresse Expressão gênica hepática	DCM: ↑ ALT ↑ Triglicerídeos hepáticos Provoca uma resposta de estresse oxidativo integrada através do ↑ de marcadores de estresse.

ATAÍDE et al. (2009)	AIN 93 AIN 93 com diferentes concentrações do óleo experimental (triheptanoín+ diheptanoín)	Recém desmamados/ 9 meses	Sim	Bioquímica sérica	Ausência de diferença significativa na bioquímica sérica O consumo crônico de di-e trieptanoínas não foi tóxico em ratos.
ZAMIN et al. (2009)	Controle DCM	45 dias/ 3 meses	Sim	Análise macroscópica e microscópica hepática	DCM: 70% de EHNA *Perda de peso com desnutrição
SILVA et al. (2008)	Controle AIN 93 AIN 93 com diferentes concentrações do óleo experimental (tri-heptanoína+ di-heptanoína).	Recém desmamados/ 9 meses	Sim	Bioquímica sérica % lipídico hepático	Controle: ↓ % lipídio hepático AIN 93 modificada: ↑ Glicemia ↓ LDL-col, LDL/HDL-col, proteínas totais Efeito hepatoprotetor dose-dependente
VETELAINEN et al. (2007)	Controle DC DCM	Animais escolhidos de acordo com o peso (250-300g) /7 semanas	Sim	Bioquímica sérica Concentração de lipídios hepáticos TBARS GSH TNF-alfa; Imuno-histoquímica para células estreladas ativadas.	A dieta DC induziu EH simples em comparação com a progressiva inflamação e fibrinogênese da dieta DCM. DC: Esteatose e inflamação ↑ Bilirrubina ↑ Triglicerídeos e colesterol total

					↑ Triglicerídeo hepático ↑ Colesterol hepático ↑ TBARS ↑ TNF-alfa Ganho de peso DCM: Maior esteatose e inflamação que o DC ↑ ALT e bilirrubina ↓ Triglicerídeos e colesterol ↑↑ Triglicerídeo hepático ↑ Colesterol hepático ↑↑ TBARS ↓ GSH ↑↑ TNF-alfa Perda de peso
SHANGARI et al. (2007)	AIN 93G termolizada AIN 93G não termolizada	Animais escolhidos de acordo com o peso (125-150g) /77 dias	-	Transcetolase GSH Metilglioxal Glioxal Proteína hidroimidazolone Nitrotirosina Adutos de carbonila	AIN 93 termolizada: ↑ AGEs ↓ Tiamina ↑ metilglioxal e glioxal e de seus adutos ↓ Glutaciona

CONCLUSÃO

Segundo a análise histológica, as dietas foram suficientes para provocar o dano hepático e independente da forma (pó ou peletes), permitindo diferenciar ou discriminar os vários estágios evolutivos da DFGNA.

As proteínas carboniladas representaram marcadores de dano hepatocelular precoce pois indicaram aumento do estresse proteico a partir da dieta padrão AIN-93. Apesar da EH em todos os grupos AIN-93, os níveis de TBARS só demonstraram a peroxidação lipídica nos danos hepáticos mais avançados (grupos DC e DCC). Os tióis totais hepáticos se comportam como o primeiro sistema de defesa antioxidante;

As enzimas antioxidantes (catalase e SOD) demonstraram diferença de expressão entre os grupos controle, padrão e deficientes em fatores lipotróficos, no entanto os níveis encontrados foram insuficientes para discriminar entre os estágios finais da DFGNA. A expressão de RAGE esteve aumentada nos grupos DCp e DCCp o que é indicativo de estresse oxidativo e inflamação hepática. Mais estudos são necessários na compreensão dos resultados para os grupos deficientes em peletes.

Para inflamação, a IL1- β revelou sincronia com os dados de RAGE e com a literatura, dado oposto ao apresentado para o TNF- α .

Este estudo foi relevante na compreensão da fisiopatologia da DFGNA associada ao EO e expressão de RAGE. No entanto, faz-se necessário seu aprimoramento para uma melhor compreensão de estágios avançados da doença.

PERSPECTIVAS

- ✓ Planejamento, desenvolvimento e aplicação de dietas modificadas a partir do modelo atual;
- ✓ Avaliação dos marcadores do perfil redox utilizados neste estudo em outros modelos de doença hepática;
- ✓ Estudos adicionais sobre RAGE para uma melhor compreensão de seu perfil na DFGNA e análise de outros marcadores de inflamação;

REFERÊNCIAS

- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International journal of experimental pathology*, v. 87, n. 1, p. 1–16, fev. 2006.
- ARMUTCU, F. et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clinical biochemistry*, v. 38, n. 6, p. 540–7, jun. 2005.
- ASSIS, A.M. Efeitos da dieta hiperlipídica aquecida e dieta hiperlipídica normal na formação de produtos finais de glicação avançada e de espécies reativas de oxigênio. 2009. 94f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2009.
- ATAÍDE, T.R. et al. Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. *International Journal of Food Science and Technology*, n. 44, p. 484–492, 2009
- ATWATER W.O.; BRYANT A.P. Dietary studies of university boat crews. USDA Office of Experiment Stations Bulletin 75. Government Printing Office, Washington, DC, 1900.
- BAKALA, H. et al. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1822, n. 10, p. 1527–34, out. 2012.
- BASTA, G. et al. What Is the Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products – Ligand Axis in Liver Injury? v. 17, p. 633–640, 2011.
- BARAIBAR, M.A.; LADOUCE, R.; FRIGUET, B. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of proteomics*, n. 92, p. 63 – 70, 2013.
- BARAK, A.J.; BECKENHAUER, H.C. The influence of ethanol on hepatic transmethylation. *Alcohol Alcohol*. n. 23, p.73-77, 1988.

BERGHEIM, I. et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *Journal of hepatology*, v. 48, n. 6, p. 983–92, jun. 2008.

BITENCOURT, A. G. V et al. Doença hepática gordurosa não alcoólica : características clínicas e histológicas em obesos graves submetidos à cirurgia bariátrica. *ACTA GASTROENTEROL LATINOAM*, v. 37, p. 224–230, 2007.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. v. 114, n. 2, 2004.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, p. 813–820, 2001.

BUETTNER, G. R. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 300, n. 535, 1993.

BUSCH, M. et al. Advanced glycation end-products and the kidney. *European journal of clinical investigation*, v. 40, n. 8, p. 742–55, ago. 2010.

CAI, W. et al. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am. J. Pathol*, n.170, p. 1893–1902, 2007.

CARILLON, J. et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free radical biology & medicine*, v. 65, p. 254–61, dez. 2013.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*, v. 142, n. 7, p. 1592–609, jun. 2012.

CAVE, M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *Journal of Nutritional Biochemistry*, n. 18, p. 184– 195, 2007.

CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 60, p. 38–44, out. 2013.

CORBIN, K. D.; ZEISEL, S. H. Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Current opinion in gastroenterology*, v. 28, n. 2, p. 159–65, mar. 2012.

COLICHON Y., A.; TOREZAN FILHO, M.; STRAUSS, E. Métodos Diagnósticos: Provas de função hepática. In: GAYOTTO, L. C. da C.; ALVES, V. A. F. (ed.). *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. São Paulo: Atheneu. p. 139-419. 2001.

CUI, Y. et al. Experimental nonalcoholic fatty liver disease in mice leads to cytochrome p450 2a5 upregulation through nuclear factor erythroid 2-like 2 translocation. *Redox Biology*, v. 1, n. 1, p. 433–440, jan. 2013.

CUPPARI, L. *Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar- Nutrição Clínica no Adulto*. São Paulo: Manole, 2005. 406p.

D'ADAMO, E. et al. What is the significance of soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in liver steatosis in obese prepubertal children? *Antioxid Redox Signal*, v.14, n. 6, p. 1167-1172, 2011.

DAY, C. P. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 16, n. 5, p. 663–678, out. 2002.

DAFFU, G. et al. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci*, v.1, n.14(10), p. 19891-910, 2013.

DESIC, S.D.; ARAGON, I.B. The FAST index – A Highly Sensitive Indicator of the Heat Impact on Infant Formula Model. *Food Chemistry*, n. 124, p. 1043–1049, 2011.

DOWMAN, J.K.; TOMLINSON, J.W.; NEWSOME, P.N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med* 2010, n. 103, p. 71–83, 2010.

DRAPER, H.H. et al. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Method Enzymol. Academic Press*, 186, pp. 421-431, 1990.

DE M BANDEIRA, S. et al. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 3265–84, 2013.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, v. 82, n. 1, p.70-77, 1959.

EDEAS, M. et al. Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathologie-biologie*, v. 58, n. 3, p. 220–5, jun. 2010.

FRACANZANI, A. L. et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 48, n. 3, p. 792–8, set. 2008.

FRIEDMAN, S. L. Targeting siRNA to arrest fibrosis Cancer biomarker profiling with microRNAs. 2008.

GAYOTTO, L.C.C.; VIANNA, M.R.; LEITÃO R.M.C. Fígado e Drogas: Doenças do Fígado e Vias Biliares. 1^oed. São Paulo: Atheneu, pp.713-749, 2001.

GAENS, K. et al. Endogenous formation of N ε-(carboxymethyl) lysine is increased in fatty livers and induces inflammatory markers in an in vitro model of. *Journal of ...*, v. 56, n. 3, p. 647–55, mar. 2012.

GAO, B.; BATALLER, R. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and New Therapeutic Targets. *Gastroenterology*, n. 141, p. 1572–1585, 2011.

GELAIN, D. P. et al. Vitamin A (retinol) up-regulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through p38 and Akt oxidant-dependent activation. *Toxicology*, v. 289, n. 1, p. 38–44, 28 out. 2011.

GEROLDI, D.; FALCONE, C.; EMANUELE, E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*, n. 13, p. 1971–1978, 2006.

GOODWIN, M. et al. Advanced glycation end products augment experimental hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* v. 28, n. 2, p. 369-76, 2013.

GUIMARÃES, E. L. M. et al. Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*, v. 52, n. 3, p. 389–97, mar. 2010.

GUO, J. et al. Protein targets for carbonylation by 4-hydroxy-2-nonenal in rat liver mitochondria. *Journal of proteomics*, n. 74, p. 2370 – 2379, 2011.

HEBBARD, L.; GEORGE, J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 8, n. 1, p. 35–44, jan. 2011.

HUDSON, B.I. et al. Soluble levels of receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, n. 25, p. 879–82, 2005.

HUTTUNEN, H.J. et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and s100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*, n. 275, p. 40096–40100, 2000.

HYOGO, H. et al. Elevated levels of serum advanced glycation end products in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 22, n. 7, p. 1112–9, jul. 2007.

International Diabetes Federation. Disponível em: <<http://www.idf.org>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2012.

International Diabetes Federation. Disponível em: < <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2012.

INNIS, S. M.; HASMAN, D. Evidence of choline depletion and reduced betaine and dimethylglycine with increased homocysteine in plasma of children with cystic fibrosis. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 8, p. 2226–31, ago. 2006.

JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *Journal of hepatology*, v. 55, n. 1, p. 227–228, jul. 2011.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 6, p. 11963–80, jan. 2013.

KIMURA, Y. et al. Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation endproducts (AGEs) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients with dyslipidemia: clinical usefulness of AGEs as a biomarker for the attenuation of NASH. *Journal of gastroenterology*, v. 45, n. 7, p. 750–7, jul. 2010.

KOEK, G. H.; LIEDORP, P. R.; BAST, A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 412, n. 15-16, p. 1297–305, 15 jul. 2011.

KOTEISHI, A.; MAE DIEHL, A. Animal models of steatohepatitis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, v. 16, p. 679–690, 2002.

KUHLA, A.; TRIEGLAFF, C.; VOLLMAR, B. Role of age and uncoupling protein-2 in oxidative stress, RAGE/AGE interaction and inflammatory liver injury. *Experimental gerontology*, v. 46, n. 11, p. 868–76, nov. 2011.

KUMAR, A. et al. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 3, n. 1, p. 12–18, mar. 2013.

LECLERCQ, I. A et al. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *Journal of hepatology*, v. 47, n. 1, p. 142–56, jul. 2007.

LEUNG, T.-M.; NIETO, N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, v. 58, n. 2, p. 395–8, fev. 2013.

LEVINE, R.L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, n. 233, p. 346-357, 1994.

LI, J. et al. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective. *Journal of the Neurological Sciences*, n. 317, p. 1–5. 2012.

LIANGPUNSAKUL, S.; CHALASANI, N. Unexplained elevations in alanine aminotransferase in individuals with the metabolic syndrome: results from the third National Health and Nutrition Survey (NHANES III). *Am J Med Sci*, v. 329, n. 3, p. 111-116, 2005.

LIEBER, C. S. et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*, n. 1, p. 502–509, 2004.

LORENZI, R. et al. Oxidative damage in the liver of rats treated with glycolaldehyde. *International journal of toxicology*, v. 30, n. 2, p. 253–8, mar. 2011.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, pp. 265-275, 1951.

LUCENA, A.L. de M. et al., High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, n. 2, p.166–172, 2010. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.200800298> [Accessed December 19, 2013].

LUEVANO-CONTRERAS, C.; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*, v. 2, n. 12, p. 1247–65, dez. 2010.

MAHER, J. J. New insights from rodent models of fatty liver disease. *Antioxidants & redox signaling*, v. 15, n. 2, p. 535–50, 15 jul. 2011.

MALAGUARNERA, M. et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, v. 87, p. 679–695, 2009.

MARCOLIN, É. et al. Methionine-and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arquivos de Gastroenterol*, n. 1, p. 72–79, 2011.

MARRA, F. et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in molecular medicine*, v. 14, p. 72–81, 2008.

MENEZES, E.F. Efeito da indução de obesidade pela dieta de cafeteria a partir dos 21 dias de idade sobre a estrutura e o desenvolvimento folicular de ratas Wistar.

2010. 55f. Dissertação (Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2010.

MIURA, K.; KODAMA, Y.; INOKUCHI, S.; et al. Toll-like receptor 9 promotes steato hepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. v. 139, n. 1, p. 323e7–34e7, 2010.

MOFRAD, P. et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 37, n. 6, p. 1286–92, jun. 2003.

MOTTA, V.T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. Porto Alegre: Ed. Médica Missau; São Paulo:Robe Editorial; 2003.

NANJI, A. A. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, v. 34, n. 1, p. 21–5, ago. 2004.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling*, v. 11, n. 12, p. 3071–109, dez. 2009.

NEWBERNE, P.M.; CAMARGO, J.L.V.D.; CLARK, A.J. Choline deficiency, partial hepatectomy and liver tumors in rats and mice. *Toxic Pathol*, n. 10, p. 95-106, 1982

NOMURA, K.; YAMANOUCHI, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 23, n. 3, p. 203–8, mar. 2012.

OLTEANU, S. et al. Lack of interleukin-1 α in Kupffer cells attenuates liver inflammation and expression of inflammatory cytokines in hypercholesterolaemic mice. *Dig Liver Dis*. 2014. pii: S1590-8658(14)00181-9. doi: 10.1016/j.dld.2014.01.156. [Epub ahead of print]

PACIFICO, L. et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 17, n. 26, p. 3082–91, 14 jul. 2011.

PADOIN, A. V. et al. Doença hepática não-alcoólica gordurosa e risco de cirrose. *Scientia Medica*, v. 18, p. 172–176, 2008.

PATEL, R. et al. Effect of dietary advanced glycation end products on mouse liver. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e35143, jan. 2012.

PATON, L.N. et al. Increased thrombin-induced polymerization of fibrinogen associated with high protein carbonyl levels in plasma from patients post myocardial infarction. *Free Radic Biol Med*, n. 48, v. 2, p. 223-229, 2009.

PAULI, J.R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PETROSILLO, G. et al. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1767, n. 10, p. 1260–7, out. 2007.

PIARULLI, F.; SARTORE, G.; LAPOLLA, A. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. *Acta Diabetologica*, v. 50, p. 101–10, 2013.

RAY, KATRINA. NAFLD—the next global epidemic. [Editorial]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v.10, p. 621, nov. 2013.

RAVEL, R. Laboratório Clínico. Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *Journal of Nutrition*, p. 838–841, 1997.

REIS, J. S. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 1, n. 4, p. 52–57, 2008.

ROGERS, A. E.; NEWBERNE, P. M. Liver and Cirrhosis Alcoholic or Nutritional Fatty Animal. *American Journal of Pathology*, v. 73, p. 817–820, 1973.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free radical biology & medicine*, v. 52, n. 1, p. 59–69, 1 jan. 2012.

ROMERO-SARMIENTO, Y. et al. Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 1, p. 219–225, jan. 2012.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, v. 19, n. 6, p. 1109–17, jun. 2011.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. NIH Public Access Author Manuscript *Eur J Nutr*. Author manuscript; available in PMC 2010 February 1. Published in final edited form as: *Eur J Nutr*. 2010 February ; 49(1): 1–9. doi:10.1007/s00394-009-0042-x. Comparison of free fructose and glucose to sucro. *Eur J Nutr*, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2010.

SANTOS, J. C. D. F. et al. Development of nonalcoholic hepatopathy: contributions of oxidative stress and advanced glycation end products. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 10, p. 19846–66, jan. 2013.

SAVOINI, G. et al. Polyunsaturated fatty acids and choline in dairy goats nutrition: Production and health benefits *Small Ruminant Research*, 2010.

SCHEEN, A. J.; LUYCKX, F. H. Obesity and liver disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 16, n. 4, p. 703–716, dez. 2002.

SHANGARI, N. et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma alpha-aldehydes and colonic inflammation in the rat. *Chem Biol Interact*, v. 169, n. 2, p. 100-109, 2007.

SHILS, M.E. et al. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. 10ed. Manole, 2009.

SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, v. 11, n. 9, p. 368-375, 2000.

SCHNEIDER, J. L.; CUERVO, A. M. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 5 nov. 2013.

SEO, H. IL et al. Which metabolic syndrome criteria best predict the presence of non-alcoholic fatty liver disease? *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2012.

SILVA, M. A. F. DA et al. Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Dieptanoína e Trieptanoína contra a Esteatose em Ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2008.

SOLÍS HERRUZO, J. A et al. Non-alcoholic fatty liver disease. From insulin resistance to mitochondrial dysfunction. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*, v. 98, n. 11, p. 844–74, nov. 2006.

SOON, R. K. et al. Stress signaling in the methionine-choline-deficient model of murine fatty liver disease. *Gastroenterology*, v. 139, n. 5, p. 1730–9, 1739.e1, nov. 2010.

SOUZA, M. R. DE A. et al. METABOLIC SYNDROME AND RISK FACTORS FOR NON-ALCOHOLIC Fatty liver disease. *Arq Gastroenterol*, n. 1, p. 89–96, 2012.

SPRUSS, A. et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 50, n. 4, p. 1094–104, out. 2009.

STARKEKEL, P.; LECLERCQ, I. A. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, v. 25, p. 319–333, 2011.

STYSKAL, J. et al. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free radical biology & medicine*, v. 52, n. 1, p. 46–58, 1 jan. 2012.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 18, n. 19, p. 2300–8, 21 maio 2012.

TAN, A.L. et al. Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, n. 298, p. 763–770, 2010.

THORNALLEY, P. J. et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *The Biochemical journal*, v. 375, p. 581–592, 2003.

TIPOE, G. L. et al. Voluntary oral feeding of rats not requiring a very high fat diet is a clinically relevant animal model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Histology and histopathology*, v. 24, n. 9, p. 1161–9, set. 2009.

TRAUNER, M.; ARRESE, M.; WAGNER, M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1801, n. 3, p. 299–310, mar. 2010.

TRIMBLE, K.C. et al. The effect of ethanol on one-carbon metabolism: increased methionine catabolism and lipotrope methyl-group wastage. *Hepatology*, n. 18, p. 984-9, 1993.

URIBARRI, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 110, n. 6, p. 911–16.e12, jun. 2010.

UTZSCHNEIDER, K.M.; KAHN, S.E. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 12, p. 4753-4756, 2006.

VALENCIA, J.V. et al. Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. *Diabetes*, v. 53, n. 3, p. 743–751, 2004.

VANNI, E. et al. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, v. 42, p. 320–330, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais

métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VASQUES, L. M. REGULAÇÃO DE RECEPTORES PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) POR VITAMINA A. p. 1–37, 2011.

VETELÄINEN, R.; VAN VLIET, A.; VAN GULIK, T. M. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 22, n. 9, p. 1526–1533, 2007.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine*, v. 251, p. 87–101, 2002.

VLASSARA, H.; STRIKER, G. E. Diabetes Pathophysiology The Role of Advanced Glycation End-products in the Etiology of Insulin Resistance and Diabetes. *US ENDOCRINOLOGY*, n. Cml, p. 14–19, 2010.

VONGHIA, L.; MICHIELSEN, P.; FRANCQUE, S. Immunological Mechanisms in the Pathophysiology of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Int J Mol Sci*. v. 14, n. 10, p. 19867–19890, 2013.

WANLESS, I.R.; SHIOTA, K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis*, v. 24, n. 1, p. 99-106, 2004.

WU, J. et al. Pentoxifylline alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis and early atherosclerosis in rats by inhibiting AGE and RAGE expression. *Acta pharmacologica Sinica*, v. 31, n. 10, p. 1367–75, out. 2010.

YAMAGISHI, S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental gerontology*, v. 46, n. 4, p. 217–24, abr. 2011.

YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 45, p. 1366–1374, 2007.

YILMAZ, Y. et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical biochemistry*, v. 42, n. 9, p. 802–7, jun. 2009.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*, v. 21, n. 6, 1998.

ZAMIN, I. et al. Modelo experimental de esteatohepatite não-alcoólica com dieta deficiente em metionina e colina. *Arq Gastroenterol*, n. 1, p. 69–74, 2009.

ZHANG, Q. et al. A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *J Proteome Res*, v. 8, n. 2, p. 754–769, 2010.

ZHOU, J. et al. Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology*, v. 134, p. 556–567, 2008.