

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

**Estudo hepático de um modelo murino dietético para síndrome metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço redox**

**GLAUCEVANE DA SILVA GUEDES**

MACEIÓ

2009

**GLAUCEVANE DA SILVA GUEDES**

**Estudo hepático de um modelo murino dietético para síndrome metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço redox**

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luíza Antas Rabêlo

MACEIÓ

2009

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária**  
**Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

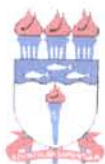
G922e Guedes, Glaucévane da Silva.  
Estudo hepático de um modelo murino dietético para síndrome metabólica :  
perfil morfológico, funcional e balanço redox / Glaucévane da Silva Guedes, 2009.  
135 f. : il.

Orientadora: Luíza Antas Rabêlo.  
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição, Maceió, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Fígado – Síndrome metabólica. 2. Funções hepáticas. 3. Fígado – Balanço redox. 4. Murino dietético. I. Título.

CDU: 612. 35



MESTRADO EM NUTRIÇÃO  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Campus A. C. Simões  
BR 104, Km 14, Tabuleiro dos Martins  
Maceió-AL 57072-970  
Fone/ fax: 82 3214-1160

---

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO

**"Estudo hepático de um modelo murino dietético para  
síndrome metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço  
redox"**

por

***Glaucevane da Silva Guedes***

A Banca Examinadora, reunida aos 28 dias do mês de abril do ano de  
2009, considera a candidata **APROVADA**.

Profa. Dra. Luíza Antas Rabêlo - Orientadora  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Centro de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Sandra Mary Lima Vasconcelos  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

Dedicado a minha mãe  
Maria Neci Guedes e  
ao meu amado Jean  
Milson Silva. Amo  
vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus,

Obrigada, Senhor, por todas as pessoas que cito aqui. Agradece-Te, também, pela vida daqueles que não me fizeram tão bem durante essa caminhada, abençoa-os Senhor, que vivam em paz e que eu possa amá-los também.

Obrigada por todas as dificuldades vividas; muito me trouxeram mais perto de Ti. Agradeço-Te por mais essa vitória! Sei que se estou escrevendo essas palavras é porque ela chegou, obrigada! Obrigada.

À Maria de Nazaré;

Minha mãezinha querida, mãe de Jesus. Somente a Senhora, como mãe (e a minha que o diga) para aguentar tantos chamados!!! Tantos pedidos de auxílio e de luz. Graças a Deus por tê-la sempre comigo!

A meu velho pai (como diria Tio Bui “o velho Mané Guede”)...

Hoje me peguei a pensar em como agradeceria ao senhor ou como o incluiria nesta parte tão importante de meu trabalho monográfico e fiquei a me questionar. O senhor não está mais aqui comigo fazendo raiva ou dando preocupação, nem ao mesmo tempo sendo o pai mais amoroso do mundo em seus bilhetinhos secretos e me pego a chorar por não ter como descrever o que sinto. Tantas inquietações ainda guardo comigo mas já não é possível “trocar umas idéias” como em outrora; mas como negar o quanto o amo? Penso, neste momento, até em paixão. Por que não? Um sentimento tão louco do qual por mais que se fuja é difícil não sentir. Um misto de alegria e de dor pela saudade, pela falta que me faz, maior que todas as dificuldades vivenciadas; tanto que outrora o denominei “meu grande mestre”: nenhuma resposta me deu; inquietações, mil! Como é grande a alegria de termos podido compartilhar tão intensamente a última de minhas comemorações acadêmicas; como é triste hoje que não possa estar aqui novamente... Pai, interceda por mim.

A mãe mais linda e maravilhosa do mundo: a minha!

Mãe, como a senhora é digna de louvores; todos os méritos, tudo o que sou. Como sofro porque sofre junto comigo todas as angústias, o cansaço, as pressões. Gostaria de poupá-la mais... Como é triste ver como tão rápido é o tempo que não nos tem permitido o colo, os

penteados improvisados nos sofá, o chamego... Tudo que tenho, se tenho algo permitido por Deus, lhe é devido. Somos tão uma que nos entendemos com poucos olhares, com um te amo... na ausência de palavras: dedico-lhe mais essa vitória!

A Jean;

Janzinho (meu querido e amado Jean), como é importante para mim. Meu porto seguro na terra, meu cúmplice, meu amigo, meu amado, meu amante, meu confidente, meu auxílio... meu querido! Agradeço-lhe por mais dois anos de paciência e companheirismo, pelos puxões de orelha, pelos colos, pelas conversas... pelo amor!

A minha amiga Fernanda;

Dia desses estávamos falando pelo telefone como estamos sentindo saudades uma da outra! Tanto companheirismo e parceria (Batman e Batman) durante tanto tempo que só o mestrado em nutrição poderia nos ter afastado de nossos encontros tão produtivos: mais para o relaxamento que para os estudos... Quantas noites varadas pela madrugada, no computador, xingando muita gente e tomando pó de guaraná, até o dia em que sofri um piripaque (hihihi). Grande parte deste momento é seu, por direito! E que venha a vida e nos leve juntas na luta!

Aos laboratórios, e professores, (de ensino, pesquisa e extensão) por onde já passei durante a caminhada acadêmica e aos colegas que por lá deixei, não me esqueço de vocês!

Aos professores com os quais convivi;

Aos laboratórios LAFI, BIOGEN e de Imunohistologia (ICBS/UFAL), nas pessoas da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Magna Suzana Alexandre Moreira, Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Eurípedes Alves da Silva Filho e Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Salete Smaniotto (respectivamente) pela abertura dos espaços por vocês coordenados, sem os quais as análises realizadas neste trabalho não poderiam ter sido realizadas;

Um tópico especial precisa ser dedicado a todos os meninos e meninas, garotos e garotas destes labs pela paciência em me receber tantos dias em seus espaços e mexendo em seus equipamentos (que eu não esqueça ninguém): LAFI: Thays Dias, Everton Tenório, Diogo Costa, Aline Cavalcanti, Anne Porfírio, Mariana Santos, Luís Agra, Yolanda Cupertino, Gabriela Muniz, Anansa de Aquino, Carolina Brito, Walfrido Bispo; BIOGEN: Ariana Sousa, Marília Barros, Eric Marques, Krystianelly Santa Rita, Joicy Verçosa, Bruna

Talita; Imunohistologia: Fagner Lima, Adalberto Alves, Maria Delma e muitíssimo especialmente a Fátima Maia, técnica responsável pelo cortes no micrótomo para a confecção das lâminas histológicas deste trabalho. Também a Karina Beltrão, Alice Orsi e Viviane Morais do Laboratório de Microbiologia Molecular pelo empréstimo das estufas.

Ao Laboratório de Reatividade Cardiovascular, REDOX, em todos os seus componentes, pela acolhida generosa a mim dispensada e pelas pequenas e grandes ajudas diárias: Gabriele Teles, Glauber Schettino, Halina Souza, Luíza Fernandes, Marcos Eleutério, Maria Marta, Weriton Ferreira; aos já não presentes: Polyana Cristina, Camila, Lidiane, Regiane, Carlos; à Cheila Juliana pelo constante apoio nos trabalhos experimentais, especialmente neste período de escrita, ao Flávio Rezende pelos desenhos das figuras utilizadas neste trabalho, ao Fábio Oliveira e Lucas Sá pela disponibilidade de auxílio em todos os momentos.

Tópico especial é merecido à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luíza Antas Rabêlo, minha orientadora, pela compreensão, acolhida, incentivo, exemplo acadêmico, conhecimento científico, auxílio, caronas, madrugadas de bancada, análise de resultados, rigor científico e pressão, no bom sentido!

À Valéria, nossa!!! Que a Fernanda não se sinta ofendida, mas como você foi minha companheira neste quase um ano de trabalho e trabalho, segurando-nos as “pontas” e quebrando-nos os “galhos”!!!

Aos onze camundongos C57BL/6J: CT.SM, CT.1D, CT.1E, CT.2D, CT.1DE, HC.SM, HC.1D, HC.1E, HC.2D, HC.2E e HC.1DE. Por que não chamá-los aqui por seus próprios nomes, se tanto contribuíram para a realização deste trabalho? Sei que estão no céu dos camundongos junto aos outros que tanto já contribuíram para o progresso das ciências!

À equipe de professores da FANUT que tanto me ajudaram no momento mais difícil desta etapa acadêmica, na mudança de orientação e trabalho de dissertação.

Aos amigos e parentes nas pessoas de minha amiga Emanuelle Costa e meu irmão Gleidson José, que, como eu, sentiram a grande ausência nestes últimos anos. Em especial a minha amiga e companheira de morada por quase sete anos! Lili (Liliane Cristina), nunca é demais agradecer tudo que fez (e faz!) por mim e pelos meus. Também à Márcia do TLC (Treinamento de Liderança Cristã) que quando perguntada sobre os pequenos “toques” dados



ao meu telefone afirmou ser apenas uma amiga que estava rezando por outra; na pessoa dela meu abraço a família TLC, que pouco tenho visto durante esta trajetória.

Aos funcionários do ICBS/UFAL pelas pequenas e grandes ajudas diárias: seu Galego (Nailson, AJ Serviços Ltda); seu Cícero de Castro e os outros meninos (Servipa Segurança Eletrônica); seu Cícero Domingos, dona Georgina Oliveira, seu Carlão Alberto e Bernadete (servidores).

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado durante todo o período.

Ao CNPq pelo fomento financeiro dispensado à realização do trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e a concretização de mais esse passo na caminhada acadêmica; se esqueci alguém, por favor, perdoe o cansaço, sinta-se abraçado através destas palavras que agora lê.

*“Tu, que habitas sob a proteção do Altíssimo, que moras à sombra do Onipotente, dize ao Senhor: ‘Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em que eu confio.’*

*(...)*

*‘Pois que se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece o meu nome. Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele. Hei de livrá-lo e o cobrirei de glória. Será favorecido por longos dias, e mostrar-lhe-ei a minha salvação.’”*

*Salmo 90 (1-2; 14-16) CONFIANÇA*

## RESUMO

**Introdução:** As alterações no estilo de vida das pessoas vem sendo dinamicamente observadas nas últimas décadas; destaque especial é dado aos aspectos dietéticos. Neste caso, como responsável direto por doenças crônicas, juntamente com outros aspectos do estilo de vida como sedentarismo, tabagismo, qualidade de vida. No contexto das doenças crônicas de elevada incidência e prevalência, a síndrome metabólica vem ganhando destaque nas pesquisas experimentais e clínicas na busca de métodos diagnósticos precoces para seus vários componentes a exemplo dos vasculares, bioquímicos e hepáticos, todos com associação também dietética. Neste contexto, destaca-se a inserção das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas como componente hepático da síndrome, sendo este o objeto central do presente trabalho. **Objetivo:** Avaliar o perfil morfológico, funcional e o balanço redox do fígado de um novo modelo murino dietético para síndrome metabólica. **Métodos:** Onze camundongos isogênicos machos C57BL/6J foram randomicamente divididos nos grupos Controle (CT) e Hipercalórico (HC) e alimentados com dieta *chow* e hipercalórica, respectivamente, durante 26 semanas. Foram procedidas avaliações plasmáticas de marcadores de função hepática (ALT, AST, ALP,  $\gamma$ -GT, LDH, albumina e proteínas totais), análise do estado redox local (SOD, CAT e peroxidação lipídica) e estudo histológico do tecido. **Resultados:** Foram encontradas elevações significativas do ponto de vista estatístico nos principais marcadores de função hepática nos animais HC. Esse aumento foi de aproximadamente 1,5 vezes para ALT, 2,5 para AST e de 7,4 para ALP. A atividade de  $\gamma$ -GT seguiu o padrão observado de elevação significativa no grupo HC, apesar de sua baixa atividade. Não foram observadas diferenças nas concentrações de albumina e proteínas totais. Relativo ao estado redox local, a atividade de SOD não foi diferente entre os grupos, a de catalase foi significativamente diminuída nos HC e os níveis de peroxidação elevados. Os achados histológicos corroboram esses resultados, sendo corresponde a doença hepática avançada nos animais HC (padrão cirrótico).

**Conclusão:** O componente hepático no novo modelo murino dietético para síndrome metabólica estudado apresenta alterações em seu perfil morfológico, funcional e no balanço redox.

**Palavras-chave:** Síndrome Metabólica, Funções Hepáticas, Balanço Redox, Novo Modelo Murino Dietético.

## ABSTRACT

**Introduction:** Changes in lifestyle of people has been dynamically observed in recent decades, emphasis is given to dietary issues. In this case, as directly responsible for chronic diseases, along with other aspects of lifestyle such as inactivity, smoking, quality of life. In the context of chronic diseases of high incidence and prevalence, the metabolic syndrome has gained prominence in clinical and experimental research in the search for early diagnostic methods for its various components such as the vascular, biochemical and liver, all also associated with diet. In this context, there was the inclusion of non-alcoholic fatty liver disease as liver component of the metabolic syndrome, which is the central object of this work. **Objective:** To evaluate the profile morphological, functional and redox balance in the liver of a novel induced-diet mice model for metabolic syndrome. **Methods:** Eleven isogenic male C57BL/6J mice were randomly divided into control (CT) and hypercaloric (HC) groups and fed with chow and hypercaloric diet, respectively, for 26 weeks. We did ratings serum markers of liver function (ALT, AST, ALP,  $\gamma$ -GT, LDH, albumin and total protein), analysis of local redox status (SOD, CAT and lipid peroxidation) and histological study of tissue. **Results:** There were significant elevations of the statistical point of view in the main markers of liver function in HC animals. This increase was approximately 1.5 times for ALT, 2.5 for AST and 7.4 for ALP. The activity of  $\gamma$ -GT followed the pattern of significant increase in the HC group, despite its low activity. There're no differences in the concentrations of albumin and total protein. On the local redox state, the activity of SOD was not different between groups, the catalase activity was significantly decreased in HC group and there're high levels of peroxidation in this same group. The histological findings corroborate these results, which corresponds to advanced liver disease in animals HC (default cirrhotic). **Conclusion:** The hepatic component in the novel induced-diet mice model for metabolic syndrome shows

changes in your profile functional, redox balance and morphological.

**Keywords:** Metabolic Syndrome, Liver Functions, Redox Balance, Novel Diet-induced Mice Model.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do desequilíbrio no balanço redox (ROVER Jr <i>et al.</i> , 2001) .....	26
<b>Figura 2.</b> Esquematização simplificada das principais alterações de estilo de vida (prática alimentar e sedentarismo) que contribuíram para o aumento da prevalência de síndrome metabólica no mundo (Adaptada de LOPES, 2007) .....	35
<b>Figura 3.</b> Alterações no metabolismo de lipoproteínas na síndrome metabólica induzem a redução na taxa catabólica das lipoproteínas que contem apoB o que resulta em aumento sérico das frações associadas a esta apoproteína. Por outro lado, ocorre elevação no catabolismo de ApoA1 resultando em diminuição dos níveis séricos de HDL. Adaptado de Adiels e Colaboradores (2008) .....	40
<b>Figura 4.</b> Fotos ilustrativas e representação esquemática do comprometimento hepático na evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica. HCC: hepatocarcinoma (Adaptado de DAY, 2002) .....	46
<b>Figura 5.</b> Principais mecanismos envolvidos na patogenia das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas pela diminuída ação da insulina, característica de resistência insulínica (RI). Hiperinsulinemia associada à RI local (1) estimula a lipogênese de novo (LDN) hepática (2) , elevando o acúmulo de triglicerídeos no fígado (5) e a lipase hormônio sensível (LHS) no tecido adiposo (3) estimulando a liberação de ácidos graxos livres na circulação (4) e assim uma captura hepática (5). O acúmulo hepático de gordura pode ser ainda acentuado pela captura dos lipídeos que chegam ao tecido a partir da alimentação, através dos quilomicrons (QM) (6) e da circulação portal, associada ao tecido adiposo visceral (TAV), o que pode aumentar ainda mais o estado de RI. Por outro lado, a capacidade oxidativa hepática pode ter seus limites excedidos (7) e assim os triglicerídeos são prioritariamente esterificados, compondo as frações de lipoproteínas. VLDL é apontada como iniciadora de alterações no metabolismo de apoproteínas com elevação nas concentrações de	

- ApoB100 e diminuição de ApoA1, associadas diretamente ao conteúdo circulante das frações de VLDL e HDL, respectivamente. (Adaptado de PAGANO *et al.*, 2002; FONSECA, 2008) ..... 52
- Figura 6.** Delineamento experimental. Camundongos C57BL/6J foram divididos randomicamente e alimentados com uma das duas dietas experimentais: *chow* (n=5) ou hipercalórica (n=6) durante vinte e seis semanas . 65
- Figura 7.** Avaliação do peso corporal dos Camundongos C57BL/6J durante 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em gramas (g) de peso corporal de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. ANOVA (duas vias) e teste de *Bonferroni*: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 ..... 75
- Figura 8.** Avaliação do crescimento dos Camundongos C57BL/6J, através do comprimento tibial (mm), após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em milímetros (mm) e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM. Teste *t de Student* não pareado ..... 75
- Figura 9.** Peso absoluto e relativo ao peso corporal do fígado dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em gramas (g) e percentual (%), respectivamente, e representam, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \*p<0,05 ..... 76
- Figura 10.** Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (B), marcadoras de função hepática, no plasma dos Camundongos C57BL/6J, em U/L, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em unidade enzimática por litro de analito (U/L), isto é, quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e representam cinco animais por grupo experimental. (C) Razão AST/ALT



(aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase), indicador de lesão e grau de comprometimento hepático nas mesmas condições experimentais. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$  .....

78

**Figura 11.** (A) Conteúdo lipídico total no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg por mg de peso tecidual. (B, C e D) Concentrações observadas no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg/dL, de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL, respectivamente, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em miligramas por miligramas de tecido e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$  .....

80

**Figura 12.** Estado redox no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. A) Atividade da SOD (superóxido dismutase) em percentual de inibição da enzima XO (xantina oxidase) por miligrama de proteína. B) Atividade da catalase em nm/min/mL normalizada pela concentração hepática de proteínas em miligrama. C) Peroxidação lipídica em concentração de MDA (malonaldeído) por miligrama de proteína. Os valores apresentados representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  .....

82

**Figura 13.** Microfotografias de cortes histológicos obtidos dos Camundongos C57BL/6J e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. As microfotografias apresentadas representam os principais achados histológicos por grupo experimental. (A e D) Histologia hepática normal do grupo Controle (CT), aumento de 40x e 100x, respectivamente. (B e C) Desarranjo da organização celular hepática, com vacuolização intracelular intensa e focos de inflamação e fibrose no grupo Hipercalórico (HC), aumento de 40x. (E) Vacuolização celular grupo HC, aumento de 100x. (F) Foco de inflamação e fibrose grupo HC, aumento de 100x .....

83

**Figura 14.** Mecanismo fisiopatológico possivelmente envolvido nos resultados encontrados nos animais HC. (1) A exposição prolongada a dieta hipercalórica culminou com a instalação de um estado de resistência à insulina (RI) que por sua vez é cauda da instalação e progressão das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) observadas (2) além de contribuir para o aumento nos níveis locais do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (4) e de alterações nas partículas de VLDL iniciadoras das demais alterações no perfil lipídico local com elevação nos níveis de triglicérides (TG), colesterol e suas frações IDL, LDL e HDL (3). Por sua vez, a progressão das DHGNA está associada ao aumento nos níveis de peroxidação lipídica local (5) que contribuem para a elevação nas espécies reativas, principalmente o radical hidroxila (OH $\cdot$ ) (6). Este então reage com  $O_2^{\cdot-}$  induzindo o aumento de  $H_2O_2$  o que possivelmente é o maior determinante da diminuição da atividade local de catalase (7) .....

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Parâmetros e pontos de corte utilizados para o diagnóstico de síndrome metabólica de acordo com diferentes recomendações de organizações e estudos publicados na literatura .....	38
<b>Tabela 2.</b> Distribuição percentual calórica fornecida pelos macronutrientes das dietas <i>chow</i> e hipercalórica oferecidas aos camundongos C57BL/6J durante o período de estudo .....	66
<b>Tabela 3.</b> Atividades plasmáticas de marcadores de função hepática através da análise bioquímica de fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase ( $\gamma$ -GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGEs** – “advanced glycation end products” (produtos finais de glicação avançada)
- AGLs** – ácidos graxos livres
- ALEs** – “advanced lipid peroxidation end products” (produtos finais de peroxidação lipídica avançada)
- ALP** – fosfatase alcalina
- ALT** – alanina aminotransferase
- AngII** – angiotensina II
- ANOVA** – análise de variância
- ApoA1** – apolipoproteína A1
- ApoB100** – apolipoproteína B100
- AST** – aspartato aminotransferase
- BHT** – “butylated hydroxytoluene” (hidroxitolueno butilado)
- CAT** – catalase
- CC** – circunferência da cintura
- CCR** – compostos carbonil reativos
- CHCl<sub>3</sub>** – clorofórmio
- COL** – colesterol total
- CRP** – proteína C reativa
- CT** – grupo Controle
- DCV** – doença cardiovascular
- DHGNA** – doença hepática gordurosa não alcoólica
- DNA** – “deoxyribonucleic acid” (ácido desoxirribonucleico)
- DIC** – delineamento inteiramente casualizado
- DMII** – diabetes tipo II
- EDTA** – “ethylenediamine tetra acetic acid” (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EHNA** – esteato-hepatite não alcoólica
- EO** – estresse oxidativo
- EPM** – erro padrão da média
- ERO** – espécie reativa de oxigênio
- ERONs** – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
- FG** – fígado gorduroso

- FSO** – Setor de Fisiologia e Farmacologia
- GSH** - glutationa
- GSHpx** – glutationa peroxidase
- HC** – grupo Hipercalórico
- HSCs** – “hepatic stellate cells” (células estreladas hepáticas)
- HDL** – “high density lipoprotein” (lipoproteína de alta densidade)
- HF** – “high fat”
- HE** – hematoxilina e eosina
- <sup>1</sup>H-MRS** – “proton magnetic resonance spectroscopy” (espectroscopia de ressonância magnética de próton)
- 4-HNE** – 4-hidroxinonenal
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio
- ICBS** – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
- IDL** – “intermediate density lipoprotein” (lipoproteína de densidade intermediária)
- IL-6** – interleucina 6
- IMC** – índice de massa corporal
- IRS-1** – “insulin receptor substrate 1” (substrato do receptor de insulina 1)
- LDH** – desidrogenase láctica
- LDL** – “low density lipoprotein” (lipoproteína de baixa densidade)
- LE** – Laboratório Experimental
- LHS** – lipase hormônio sensível
- LPL** – “lipoprotein lipase” (lipase lipoproteica)
- LRC** – Laboratório de Reatividade Cardiovascular
- MDA** – malondialdeído
- MDC** – *Max Delbrück Center for Molecular Medicine*
- MeOH** – metanol
- MTP** – “microsomal triglyceride transfer protein” (proteína de transferência de triglicerídeo microsomal)
- NaCl** – cloreto de sódio
- NADPHox** – NADPH oxidase
- NO** – “nitric oxide” (óxido nítrico)
- NOS** – “nitric oxide synthase” (óxido nítrico sintase)
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – ânion radical superóxido
- ONOO<sup>-</sup>** – peroxinitrito

- PA** – pressão arterial
- PAI-1** – “plasminogen activator inhibitor 1” (inibidor do ativador de plasminogênio 1)
- PBS** – “phosphate buffered saline” (tampão fosfato salino)
- PMSF** – “*p*-Phenyl-MethylSulfonyl-Fluoride” (*p*-fenil-metilsulfonil fluoreto)
- PPAR $\gamma$**  – “peroxisome proliferator activated receptor gamma” ( $\gamma$ -receptor de proliferador de peroxissoma ativado)
- PTNs** – proteínas totais
- RCQ** – relação cintura quadril
- RER** – retículo endoplasmático rugoso
- RI** – resistência à insulina
- RNAm** – “ribonucleic acid”; (ácido ribonucleico mensageiro)
- SDS** – “sulfatedodecylde sodium” (dodecil sulfato de sódio)
- SM** – síndrome metabólica
- SNAS** – sistema nervoso autônomo simpático
- SOCS** – “suppressors of cytokine signaling” (proteínas supressoras de sinalização citocina)
- SOD** – superóxido dismutase
- SRA** – sistema renina-angiotensina
- SRBP-1** – “sterol regulatory element-binding protein” (proteína ligadora do elemento regulatório de esterol)
- TBA** – “thiobarbituric acid” (ácido tiobarbitúrico)
- TBARS** – “thiobarbituric acid reactive substances” (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
- TG** – triglicerídeos
- TNF- $\alpha$**  – “tumoral necrose factor  $\alpha$ ” (fator de necrose tumoral  $\alpha$ )
- UFAL** – Universidade Federal de Alagoas
- UniBH** – Universidade de Belo Horizonte
- VLDL** – “very low density lipoprotein” (lipoproteína de muito baixa densidade)
- WST-1** – *2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium*
- XO** – xantina oxidase
- $\gamma$ -GT** – gama glutamiltransaminase

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL</b> .....	ix
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xviii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>1.1 Problematização</b> .....	25
<b>1.2 Problema</b> .....	28
<b>1.3 Hipóteses</b> .....	29
1.3.1 Hipótese nula .....	29
1.3.2 Hipótese alternativa .....	29
<b>1.4 Objetivos</b> .....	30
1.4.1 Objetivo geral .....	30
1.4.2 Objetivos específicos .....	30
<b>1.5 Justificativa</b> .....	31
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	33
<b>2.1 Contexto epidemiológico</b> .....	33
<b>2.2 A síndrome metabólica</b> .....	36
2.2.1 Patogenia da síndrome metabólica .....	39
2.2.2 O papel do desbalanço redox na síndrome metabólica .....	41
<b>2.3 Doença hepática gordurosa não alcoólica como componente hepático da síndrome metabólica</b> .....	44

2.3.1 Diagnóstico .....	54
2.3.2 Terapêutica .....	56
<b>2.4 Modelos experimentais de DHGNA e SM .....</b>	<b>60</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2 Grupo amostral .....</b>	<b>64</b>
<b>3.3 Delineamento experimental .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4 Dieta e crescimento do modelo murino .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5 Avaliação hepática .....</b>	<b>66</b>
3.5.1 Sacrifício e retirada do órgão .....	66
3.5.2 Análises bioquímicas .....	67
3.5.3 Análise do conteúdo lipídico hepático .....	68
3.5.3.1 Lipídeos hepáticos totais .....	68
3.5.3.2 Triglicerídeos, colesterol total e frações no tecido hepático .....	68
<b>3.6 Avaliação do estado redox hepático .....</b>	<b>69</b>
3.6.1 Obtenção do homogenato hepático .....	69
3.6.2 Medida da peroxidação lipídica .....	69
3.6.3 Mensuração da atividade da superóxido dismutase .....	70
3.6.4 Mensuração da atividade da catalase .....	71
<b>3.7 Análise histológica do fígado .....</b>	<b>71</b>
<b>3.8 Análises estatísticas .....</b>	<b>72</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>98</b>



<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	100
<b>9 APÊNDICE</b> .....	113
<b>10 ANEXO</b> .....	135

**INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

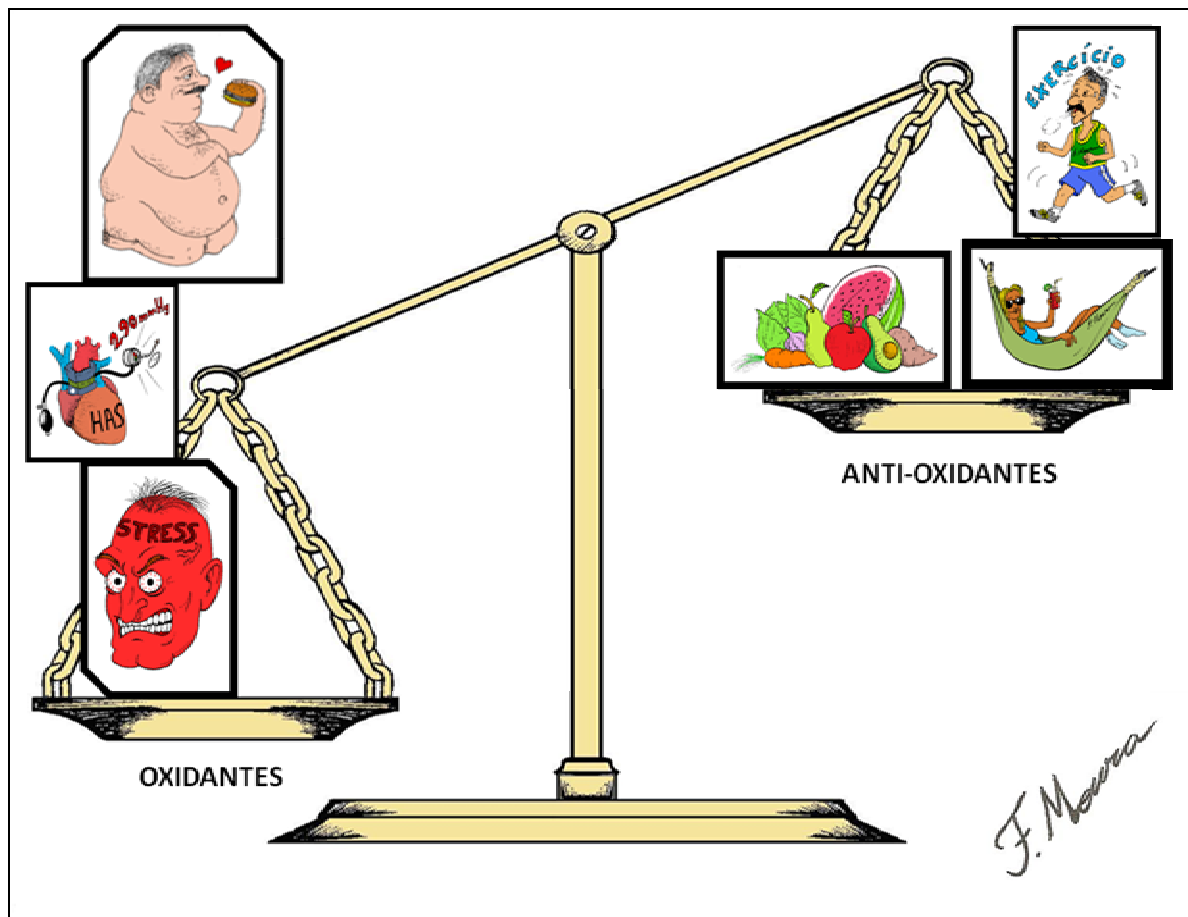
## 1.1 Problematização

As mudanças dietéticas contemporâneas em especial, as práticas alimentares inadequadas com elevadas ingestões de ácidos graxos saturados, carboidratos simples, sódio e baixos níveis de fibras e antioxidantes e outras condições de estilo de vida como sedentarismo, concorrem para a elevação das taxas de doenças crônicas de causas passíveis de prevenção como a síndrome metabólica (SM) (MOLNAR *et al.*, 2005; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007).

Estas mudanças podem compor um espectro de fatores de risco capazes de induzir alterações sistêmicas e locais nos sistemas fisiológicos de regulação da homeostase. Especial destaque é dado ao possível desequilíbrio no balanço redox tanto sistêmico quanto local (Figura 1). O estado redox, em termos gerais, corresponde ao equilíbrio entre os estados pró-oxidativo e anti-oxidativo. Este balanceamento entre a formação e a remoção de espécies oxidativas no organismo precisa ser regulado de maneira que reações e processos metabólicos que sejam dependentes destas espécies ocorram em níveis adequados para a manutenção da fisiologia celular (ROVER Jr *et al.*, 2001).

Tem sido evidenciado que o aumento do estresse oxidativo (EO) hepático pode promover, entre outras alterações, a lipoperoxidação de membranas e a ativação de células inflamatórias que promovem diversas alterações fisiopatológicas e cursam para processos patológicos de consequências diversas de acordo com a intensidade, duração e efeito da causa agressora sobre o tecido. Esta condição de estresse pode ser subsequente à sobrecarga de ácidos graxos ao fígado, que pode saturar o sistema antioxidante. Neste contexto, as dietas hipercalóricas e hiperlipídicas, como as praticadas principalmente nas populações ocidentais,

podem ser uma das possíveis causas desse desequilíbrio orgânico (DAY, 2002; BROWING & HORTON, 2004; McCULLOUGH, 2006; LECLERQ *et al.*, 2007; QURESHI & ABRAMS, 2007; ADIELS *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Representação esquemática do desequilíbrio no balanço redox (ROVER Jr *et al.*, 2001).

Assim, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) surgem como o componente hepático da síndrome metabólica e configuram-se como tema atual de pesquisas (FESTI *et al.*, 2004; BOER *et al.*, 2004; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007).

As DHGNA compreendem um espectro amplo de manifestações hepáticas, não associadas ao consumo de álcool ou a outros agravos no órgão de causa etiológica determinada, que vão desde a infiltração gordurosa simples nos hepatócitos, denominada esteatose, passando por esteatohepatite não alcoólica (EHNA), infiltração de Mallory, fibrose

e cirrose, podendo, mesmo que raramente, evoluir para hepatocarcinoma (BROWNING & WORTON, 2004; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007; QURESHI & ABRAMS, 2007; ADIELS *et al.*, 2008; CONG *et al.*, 2008). A esteatose hepática ainda é relatada como sendo um tipo de infiltração celular reversível e possivelmente benigno (COTRAN *et al.*, 2000). Mantena e Colaboradores (2008), apesar de concordarem que a esteatose pode ser uma condição reversível, apontam-na como uma condição não benigna podendo representar o primeiro passo para a progressão de patologias mais severas do órgão, em conformidade com o observado na evolução das DHGNA. Este espectro de doenças hepáticas apresenta-se como a principal causa de cirrose criptogênica (PAGANO *et al.*, 2002; FESTI *et al.*, 2004).

A prevalência de tais agravos é descrita na literatura porém, observa-se diferenças entre as taxas, especialmente relacionadas a variações geográficas e ao desenho metodológico dos estudos (KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007). Estima-se, porém, que entre 14 e 24 % da população apresente algum grau de infiltração hepática gordurosa de origem não alcoólica assintomática, sendo apontada ocasionalmente por métodos comuns de imagem (BROWNING & HORTON, 2004). Contudo, a maior dificuldade diagnóstica relaciona-se ao fato de que ainda não há um marcador específico para o agravo, além da baixa sensibilidade de métodos pouco invasivos clinicamente utilizados (FESTI *et al.*, 2004; MEDINA *et al.*, 2004; ALLARD *et al.*, 2008). As transaminases, que, em geral, estão alteradas em casos de lesão hepática, podem apresentar-se em seus níveis normais. Entretanto, constata-se que grande parte dos diagnósticos ainda é sequencial ao achado incidental de taxas sanguíneas elevadas destes parâmetros. Estima-se que apenas 17 % dos casos totais de pacientes com DHGNA, avaliados por espectrometria de ressonância magnética de próton (<sup>1</sup>H-MRS), apresentem taxas elevadas destas enzimas (KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007).

Sabe-se que o fígado encontra-se no centro do metabolismo de macro e micronutrientes, da depuração de substâncias tóxicas, da síntese de proteínas, de bile, de

fatores de coagulação e do armazenamento de moléculas. É notório assim, que alterações patológicas no órgão podem ter grandes e importantes repercussões na manutenção e na qualidade da vida, cujas consequências variam de acordo com causa, intensidade e duração da exposição aos fatores lesivos (MAIO *et al.*, 2000). No caso específico das DHGNA, o contexto local e sistêmico das agressões concorrentes na síndrome metabólica, como a infiltração gordurosa persistente e gradativa, decorrente, principalmente, da alteração do metabolismo lipídico e glicídico e acúmulo de substâncias inflamatórias, pode determinar o agravamento do comprometimento hepático e, desta forma, a alteração das funções do órgão.

## 1.2 Problema

Como dito, as DHGNA, em especial a esteatose, têm sido apontadas como o componente hepático da SM (FESTI *et al.*, 2004; BOER *et al.*, 2004; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007). No contexto dos estudos realizados acerca do tema, o uso de modelos animais, com destaque aos murinos, apresenta-se relevante na busca de uma compreensão mais aprofundada dos diversos aspectos componentes (GADJA *et al.*, 2007). Assim, o modelo murino dietético para síndrome metabólica utilizado neste trabalho, de maneira semelhante aos demais modelos animais de experimentação, procura assemelhar-se ao máximo com um fenótipo humano. Diante do exposto, o presente estudo busca responder a seguinte questão: o fígado de um modelo murino dietético para síndrome metabólica, alimentado com dieta *high fat* mas, sem o desenvolvimento de obesidade está alterado?

### **1.3 Hipóteses**

#### **1.3.1 Hipótese nula**

O fígado não se encontra alterado em um novo modelo murino dietético de síndrome metabólica.

#### **1.3.2 Hipótese alternativa**

O fígado encontra-se alterado em um novo modelo murino dietético de síndrome metabólica.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo geral**

- Avaliar o perfil morfológico, funcional e o balanço redox do fígado de um novo modelo murino dietético para síndrome metabólica.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Investigar as alterações de marcadores de função hepática no modelo estudado;
- Mensurar o teor lipídico, de triglicerídeos, de colesterol total e de suas frações do tecido hepático;
- Avaliar a atividade de enzimas envolvidas no balanço redox presentes no tecido;
- Analisar os níveis de peroxidação lipídica no órgão;
- Caracterizar as alterações morfo-histológicas hepáticas.



## 1.5 Justificativa

As taxas de morbidade e mortalidade, associadas aos componentes da síndrome metabólica, têm-se elevado dentre os indivíduos de diferentes etnias decorrente, principalmente, das alterações no estilo de vida, com destaque para o componente dietético. Apesar de grande parte dos óbitos terem associação direta com os componentes vasculares da síndrome, as DHGNA têm ganhado destaque na literatura atual como o componente hepático da mesma. Contudo, semelhantes aos demais parâmetros que caracterizam o perfil sindrômico, muitas vezes apresentam-se de forma assintomática, o que pode acentuar o grau de comprometimento do órgão e, assim, do indivíduo (McCULLOUGH, 2006; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007; QURESHI & ABRAMS, 2007).

Neste contexto, é crescente a busca por métodos diagnósticos precoces e por uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos patológicos envolvidos no agravo, de maneira à melhor direcionar as ações preventivas e medidas terapêuticas (DAY, 2002; AGRAWAL & BONKOVSKY, 2002; McCULLOUGH, 2006; ADIELS *et al.*, 2008). Assim, os modelos murinos têm destaque devido, principalmente, à semelhança genética com o homem e à facilidade de manejo como tamanho, necessidade de menor espaço, rápida reprodução (MOLNAR *et al.*, 2005; ANSTEE & GOLDIN, 2006; FITZGERALD *et al.*, 2007; CONG *et al.*, 2008), sendo o protótipo proposto neste trabalho para avaliar o componente hepático em modelo dietético para síndrome metabólica.



**REVISÃO DA LITERATURA**

**2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Contexto epidemiológico

O comportamento dietético, especialmente o ocidental, sofreu intensa mudança no decurso das últimas décadas do século XX. Esta foi denominada transição nutricional, caracterizada pela alteração na prática dietética com o aumento do consumo de itens alimentares de elevados conteúdos lipídicos e glicídicos em detrimento daqueles *in natura*, como frutas e demais vegetais. Isoladamente, já representa a possibilidade do desenvolvimento de deficiências nutricionais, a citar as de micronutrientes. Entretanto, a maior alteração no perfil nutricional da população é representada pela diminuição na prevalência de desnutrição e pelo aumento da obesidade (OLIVEIRA, 2004).

A transição nutricional tem sido atribuída também a outras mudanças no estilo de vida, em especial, ao ritmo acelerado dos grandes centros urbanos. A necessidade de realizar refeições cada vez mais rápidas e fora do domicílio, aliada à facilidade de aquisição e pronto consumo dos referidos alimentos, estão entre as razões para estas mudanças. Destaca-se que o principal fator é a qualidade da alimentação, não somente comer muito ou adquirir excesso de tecido adiposo (FONSECA, 2008). Desta forma, o tipo de dieta consumida tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crônicas. Interessantemente, as populações que praticam a chamada dieta mediterrânea, rica em frutas, vegetais, peixes e azeite de oliva, associada ao consumo de quantidade diária moderada de vinho, têm apresentado maior expectativa de vida e menor prevalência de doenças crônicas, comparadas às populações de práticas ocidentais. A prática mediterrânea, em termos de nutrientes, corresponde a maiores quantidades de ácidos graxos monoinsaturados, fibras, antioxidantes, balanço equilibrado entre os aportes de ácidos graxos polinsaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 e baixo consumo de ácidos graxos saturados (URQUIAGA *et al.*, 2004).

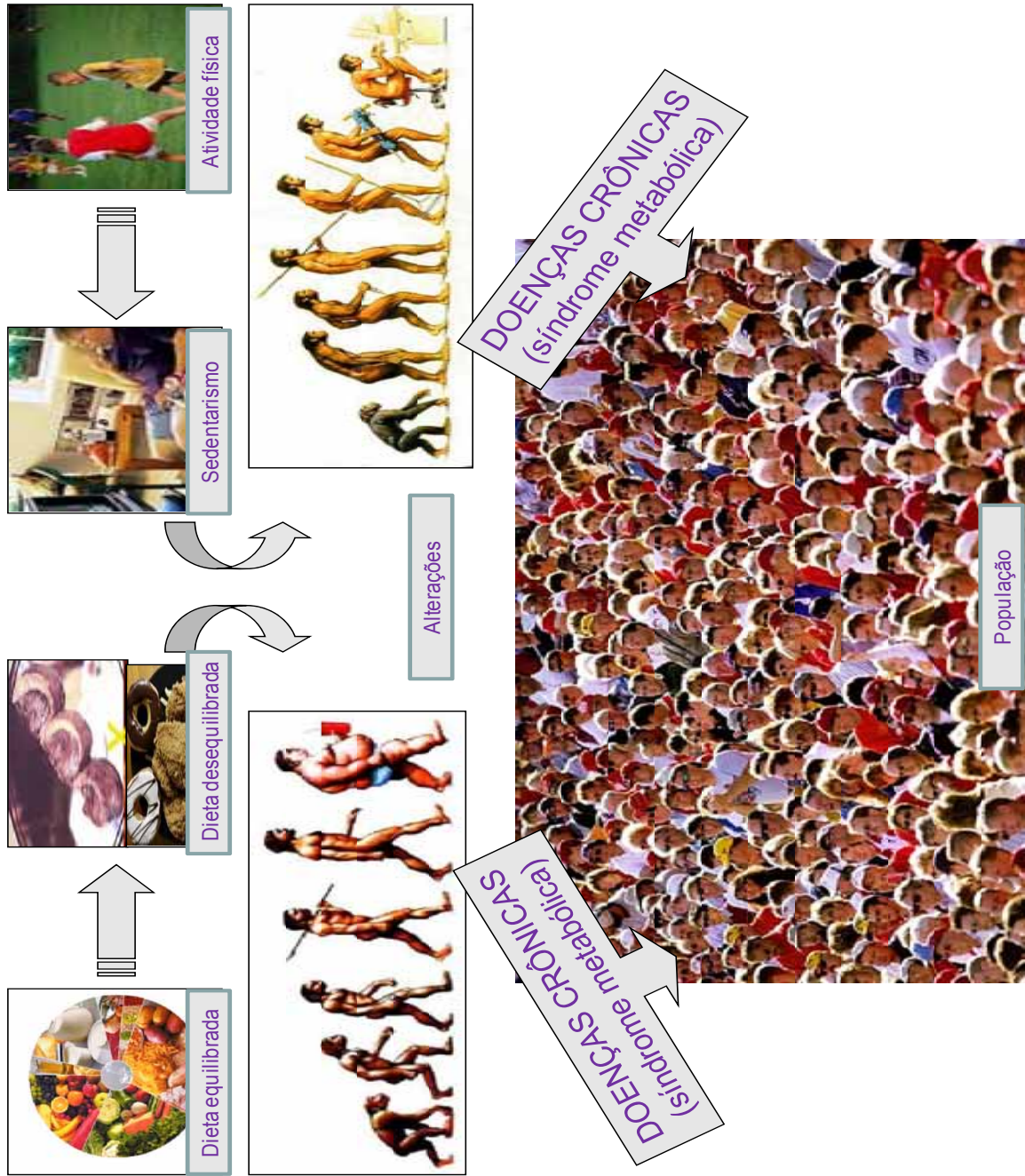
Uma segunda, mas também importante, alteração no estilo de vida da população é

o aumento do sedentarismo. Observado principalmente nos maiores centros urbanos, encontra-se associado a diversos fatores como falta de tempo para a prática de exercício físico, melhoria no acesso aos meios de transporte e desta forma diminuição na prática de caminhadas, maior acesso aos meios de comunicação e outros entretenimentos eletrônicos em lugar da prática de atividades lúdicas ao ar livre, situação acentuada pelo medo da violência em vias públicas. Ainda mais grave é a associação entre comportamento alimentar inadequado e sedentarismo (LOPES, 2007). Assim, o resultado, em geral, é o aparecimento da obesidade, grave problema de saúde pública atual, resultado do desbalanço entre o consumo energético devido ao suprimento abundante e o reduzido gasto metabólico devido à atividade física reduzida (BARNES *et al.*, 2007).

Relatos da literatura mostram que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) são excessivamente produzidas na presença da obesidade, o que pode predispor a outras morbidades metabólicas (FURUKAWA *et al.*, 2004). Destaca-se também o componente genético e o tabagismo como outros fatores também importantes à introdução do conceito de outra grande transição do final século XX: a epidemiológica. Esta é caracterizada pela diminuição das taxas de doenças infectoparasitárias e pelo aumento das doenças crônicas de causas passíveis de prevenção (PRATA, 1992).

Salienta-se que práticas alimentares saudáveis com o consumo de alimentos *in natura*, controle do consumo calórico e de gorduras totais, a prática regular de atividades físicas com a diminuição do sedentarismo e a abstenção da prática do tabagismo estão entre os principais meios de prevenção da maioria das doenças crônicas que vêm assolando a população. A figura 2 ilustra o contexto epidemiológico descrito.

**Figura 2.** Esquemática das principais alterações de estilo de vida (prática alimentar e sedentarismo) que contribuíram para o aumento da prevalência de síndrome metabólica no mundo (Adaptada de LOPES, 2007).



## 2.2 A síndrome metabólica

Datam da década de 60 as primeiras descrições acerca da síndrome metabólica, agravo caracterizado pela associação de diversas anormalidades metabólicas (AVOGARO *et al.*, 1965). Ao longo dos anos esta síndrome, também conhecida por síndrome do quarteto mortal, síndrome X, síndrome plurimetabólica, síndrome da resistência à insulina e, por fim, síndrome metabólica, tem sido foco de inúmeras investigações nas ciências básicas e aplicadas, particularmente por sua principal característica: ser multifatorial e, assim, requerer atenção multidisciplinar (ÁVILA, 2004; LOPES, 2007). Esta síndrome é uma desordem metabólica de crescente prevalência. Relatos têm apresentado taxas na ordem de 25 % na população dos Estados Unidos (FORD *et al.*, 2002). No Brasil, não foram publicados estudos populacionais representativos da população em geral. As diferentes taxas de prevalência variam em função das diversas classificações diagnósticas adotadas pelos estudos, além das variáveis geográficas inerentes às amostras descritas. Entretanto, tem-se apresentado de forma crescente e os estudos epidemiológicos em geral apontam o componente dietético como uma das causas deste fenômeno (BROWNING & HORTON, 2004; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007).

Entre os indivíduos portadores de obesidade e/ou diabetes tipo II (DMII) esta prevalência chega a atingir 75 % (FESTI *et al.*, 2004). Crianças e adolescentes também têm desenvolvido tal agravo, sendo crescente o número de diagnósticos de aterosclerose coronariana e de outros fatores de risco neste grupo populacional (CHEN & BERENSON, 2007). Além disso, o aumento do sobrepeso e da obesidade entre crianças e adolescentes tem crescido enormemente nos últimos anos. De acordo com estimativas recentes, 17,1 % das crianças e adolescentes com idade entre 2 e 19 anos encontram-se acima do peso (OGDEN *et al.*, 2006). Desta forma, a síndrome metabólica torna-se um problema de saúde pública

também nesta população (CHEN & BERENSON, 2007).

Corroborando estes relatos, Ferreira e Colaboradores (2007), verificaram prevalência de SM em 17,3 % de uma população composta por 52 crianças com idade entre 7 e 10 anos classificadas como obesas através de um índice de massa corporal (IMC) acima do percentil 95. Em uma população de adolescentes obesos avaliados em Lima, Peru, a taxa de SM observada foi de 22,9 % (PAJUELO *et al.*, 2007). Porém, segundo Chen e Berenson (2007) ainda não existe um critério disponível para a avaliação específica deste grupo populacional. Estes autores ressaltam a necessidade de estabelecimento destes parâmetros, diante dos diferentes conceitos diagnósticos que os estudos em crianças vêm adotando para o diagnóstico e prevalência da síndrome, especialmente, diferentes pontos de corte para classificação de obesidade, chamando atenção para o fato de que o IMC tem sido utilizado como estratificador e componente da mesma, o que não deve ser tomado como fator suficiente de avaliação (CHEN & BERENSON, 2007), visto que semelhante ao portador adulto, é a associação de diferentes parâmetros alterados o que caracteriza a síndrome.

Algumas publicações têm apresentado diferentes descrições dos componentes que caracterizam a SM. A tabela 1 sumariza os principais parâmetros e pontos de corte adotados para o diagnóstico humano da mesma, descritos na literatura. Nestas descrições também podem ser encontrados relatos comparativos entre os resultados obtidos através da utilização dos diferentes pontos de corte descritos (CAMERON *et al.*, 2004).

**Tabela 1.** Parâmetros e pontos de corte utilizados para o diagnóstico de síndrome metabólica de acordo com diferentes recomendações de organizações e estudos publicados na literatura

<i>OMS<sup>1</sup> (1998)</i>	<i>ATP III<sup>2</sup> (2001)</i>	<i>IDF<sup>3</sup> (2005)</i>
Hiperinsulinemia ou regulação de glicose alterada e 2 outros fatores:	Três ou mais fatores:	CC elevada, de acordo com a etnia, e pelo menos 1 fator:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TG<sup>4</sup> (mg/dL) &gt; 150</li> <li>• HDL<sup>5</sup> (mg/dL) &lt; 35 P/H<sup>6</sup> e &lt;39 P/M<sup>7</sup></li> <li>• Tratamento anti-hipertensivo ou PA<sup>8</sup> (mmHg) ≥ 140 e/ou ≥ 90</li> <li>• RCQ<sup>9</sup> &gt; 0,90 P/H e &gt; 0,85 P/M</li> <li>• Microalbuminúria (mg/min) ≥ 20</li> <li>• IMC<sup>10</sup> &gt; 30 kg/m<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TG (mg/dL) &gt; 150</li> <li>• HDL (mg/dL) &lt; 40 P/H e &lt; 50 P/M</li> <li>• PA (mmHg) ≥ 130 e/ou ≥ 85</li> <li>• CC<sup>11</sup> (cm) &gt; 102 P/H e &gt; 88 P/M</li> <li>• Glicemia de jejum (mg/dL) ≥ 110</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TG (mg/dL) &gt; 150</li> <li>• HDL (mg/dL) &lt; 40 P/H e &lt; 50 P/M</li> <li>• PA (mmHg) ≥ 135 e/ou ≥ 85</li> <li>• Tratamento para dislipidemia e pressão arterial</li> <li>• Glicemia de jejum (mg/dL) ≥ 100</li> </ul>

<sup>1</sup>Organização Mundial de Saúde; <sup>2</sup>*Adult Treatment Panel III*; <sup>3</sup>*International Diabetes Federation*; <sup>4</sup>triglicerídeos; <sup>5</sup>*high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade); <sup>6</sup>para homens; <sup>7</sup>para mulheres; <sup>8</sup>pressão arterial; <sup>9</sup>relação cintura quadril; <sup>10</sup>índice de massa corporal; <sup>11</sup>circunferência da cintura.

No Brasil, conforme adotado na I Diretriz Brasileira no Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (2004), a definição utilizada é a do ATP III (2001) que apresenta pequenas diferenças em relação aos critérios usados pela OMS (Tabela 1). Contudo, a III Diretriz Brasileira de Diabetes adota os critérios definidos pelo IDF (2005), bem como diversos estudos posteriores a essa publicação.

As alterações metabólicas relativas ao perfil lipídico, ao glicídico, à elevação da pressão arterial (PA) e de medidas corporais associadas ao depósito adiposo são consensualmente consideradas em todas as classificações diagnósticas (Tabela 1). Mais recentemente, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) foram descritas como o componente hepático da SM, sendo atualmente um parâmetro diagnóstico da mesma (KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007).

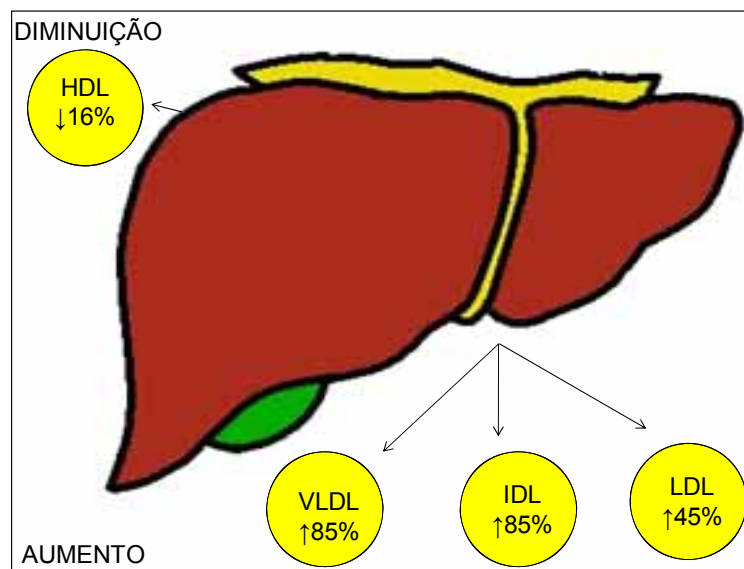


### 2.2.1 Patogenia da síndrome metabólica

A partir da descrição clássica de Reaven (1988), a SM foi baseada na presença de resistência insulínica (RI), estado de reduzida resposta dos tecidos à ação da insulina. Trata-se, pois de uma característica chave da SM, podendo estar diretamente associada aos demais componentes sindrômicos. Esta pode ser inicialmente representada pela presença de tolerância à glicose diminuída, cujo prolongamento, em geral, culmina com DMII (BERGMAN *et al.*, 2007). Ambos, RI e DMII, podem ser caracterizados por dislipidemia, que é um importante e comum fator de risco cardiovascular. Segundo Adiels (2006), uma das anormalidades metabólicas que ocorrem é a produção de VLDL (“very low density lipoprotein”; lipoproteína de muito baixa densidade) em partículas aumentadas que atuam como iniciadoras de mudanças nas lipoproteínas, resultando, assim, em altos níveis de partículas menores de LDL (“low density lipoprotein”; lipoproteína de baixa densidade) e mais baixos níveis de HDL (“high density lipoprotein”; lipoproteína de alta densidade). A dislipidemia, neste caso, é caracterizada por altos níveis de triglicédeos (TG), baixos de HDL e/ou pelo aparecimento de LDLs pequenas e densas, com lipídemia pós-prandial. Segundo Adiels (2008), estas alterações metabólicas precedem o diagnóstico de DMII, podendo esta investigação ser utilizada como parâmetro de rastreamento para instalação de tais alterações no metabolismo lipídico.

Como dito, a produção hepática excessiva de VLDL é apontada como iniciadora de mudanças no metabolismo de lipoproteínas (ADIELS *et al.*, 2006). A síntese de VLDL envolve uma lipidação da apoproteína B100 (apoB100) no fígado que corresponde ao passo inicial. Este processo é realizado pela proteína de transferência microssomal de triglicérido (MTP; “microssomal triglyceride transfer protein”) no retículo endoplasmático rugoso (RER) resultando na formação de uma partícula de lipoproteína pré-VLDL que é secretada após

lipidação adicional. A formação de VLDL é altamente dependente do acúmulo de TG no citosol. Depois de liberada do fígado pode ser convertida em IDL (“intermediate density lipoprotein”; lipoproteína de densidade intermediária) pela lipase lipoproteica (LPL; “lipoprotein lipase”) e esta em LDL. Esta, por sua vez, é rica em colesterol e catabolisada, principalmente, através do reconhecimento hepático pelos seus receptores de LDL. Concentrações anormais de lipídeos e apolipoproteína podem decorrer de mudanças na produção, conversão ou catabolismo de lipoproteínas. Somando-se a isso, uma aumentada liberação de ácidos graxos eleva a secreção de VLDL-TG e apoB100 do fígado. Interessantemente, mecanismos compensatórios estão associados aos níveis menores de HDL pela diminuição da apoproteína A1 (ApoA1), carreadora desta lipoproteína (ADIELS *et al.*, 2008) (Figura 3). Assim, a desregulação no metabolismo hepático de lipídeos pode apresentar papel chave na patogênese de SM, com desenvolvimento de esteatose hepática, dislipidemia e RI (BIDDINGER *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Alterações no metabolismo de lipoproteínas na síndrome metabólica induzem a redução na taxa catabólica das lipoproteínas que contêm apoB o que resulta em aumento sérico das frações associadas a esta apoproteína. Por outro lado, ocorre elevação no catabolismo de ApoA1 resultando em diminuição dos níveis séricos de HDL. Adaptado de Adiels e Colaboradores (2008).

Um aumento na concentração de ácidos graxos na circulação contribui para ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). Este evento pode induzir a disfunção endotelial, aumento dos níveis circulantes de cortisol, retenção de sódio e aumento da PA. Além disso, o estado de lipotoxicidade pode agravar a falência das células  $\beta$  do pâncreas, contribuindo para a manutenção nos níveis glicêmicos elevados, agravados pela RI (FONSECA, 2008).

Somando-se aos fatores citados, pode ainda participar da patogenia da SM uma produção desregulada de adipocitocinas, associada à obesidade, através da produção aumentada de TNF- $\alpha$  (“tumoral necrose factor  $\alpha$ ”; fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) por mecanismos ainda não elucidados (FURUKAWA *et al.*, 2004).

### **2.2.2 O papel do desbalanço REDOX na síndrome metabólica**

O metabolismo normal é caracterizado pelo equilíbrio entre substâncias pró-oxidativas e anti-oxidativas, como uma balança de dois pesos em potencial equilíbrio (Figura 1). Contudo, várias são as situações que podem gerar um desequilíbrio negativo neste balanço ou estado redox.

Os sistemas orgânicos produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), e citocinas pró-oxidativas, onde as principais fontes fisiológicas destas espécies são a mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, a NADPH oxidase (NADPHox), que catalisa a redução de um elétron do oxigênio molecular para gerar ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) usando NADPH como doador de elétron, a mieloperoxidase, a NOS (“nitric oxide syntase”; óxido nítrico sintase) desacoplada e a xantina oxidase (XO) (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2009).

O complexo enzimático NADPHox pode estar presente em diferentes tipos celulares como componente dos mecanismos de sinalização redox. Interessantemente, o tratamento de camundongos obesos com inibidor desta enzima reduz a produção de ERONs no tecido adiposo, sugerindo a participação da enzima no EO e por diminuir a desregulação de adipocitocinas e melhorar diabetes, hiperlipidemia e esteatose hepática, apontando a NADPHox como importante fonte de ERONs e a ação deletéria destas em quantidades excessivas (FURUKAWA *et al.*, 2004). Assim, quantidades elevadas de ERONs podem ter efeitos deletérios nos sistemas orgânicos por oxidação irreversível de lipídeos, proteínas e DNA (“dexyribonucleic acid”; ácido desoxirribonucleico), inibindo a função celular normal, associados à progressão de doença cardiovascular (DCV) (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2009).

Por sua vez, o  $O_2^{\cdot-}$  é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que atua tanto na geração de outras espécies reativas quanto na ação deletéria direta a parede vascular, podendo diminuir a biodisponibilidade de óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), que é um fator relaxante derivado do endotélio, e reagir com este composto para formar o peroxinitrito ( $\bullet ONOO^-$ ). Este, por sua vez, é altamente reativo e atuante direto no fenômeno de peroxidação lipídica (FEILLET-COUNDRAY *et al.*, 2009).

A peroxidação lipídica pode ser induzida por substâncias oxidantes e gerar uma grande variedade de produtos que incluem compostos carbonil reativos (CCR) e outros produtos como cetonas e alcanos. Os CCR são formados durante a peroxidação lipídica e a glicoxidação de carboidratos sendo precursores dos produtos finais de glicação avançada (AGEs; “advanced glycation end products”) e peroxidação lipídica avançada (ALEs; “advanced lipid peroxidation end products”) que reagem com proteínas, lipídeos e DNA. O estresse carbonil, como é conhecido, induz progressivamente a disfunções das proteínas e prejuízos nos tecidos, o que pode gerar ainda inflamação e apoptose celular. Um dos principais CCR formado durante a peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), que

apresenta importante papel na modificação de LDL. Este aldeído e outros CCR, como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), reagem com resíduos de lisina de ApoB, alterando a afinidade pelo receptor e desviando o metabolismo para células *scavenger* como macrófagos, posteriormente transformados em células espumosas, características de lesões ateroscleróticas e diretamente envolvidas nos mecanismos de ativação inflamatória, mitogênica e pró-apoptótica (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2008).

Normalmente, as células são dotadas de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que combatem as ERONs, neutralizando-as. Fazem parte deste sistema de defesa as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSHpx). A enzima SOD possui três isoformas: uma citosólica (SOD<sub>CuZn</sub>), uma mitocondrial (SOD<sub>Mn</sub>) e outra extracelular (SOD<sub>EC</sub>). Esta atua na dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (O<sub>2</sub><sup>-</sup> + O<sub>2</sub><sup>-</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O). Este composto, por sua vez é convertido em água e oxigênio pela atividade das enzimas GSHpx e CAT, esta última sendo a maior responsável pela detoxificação daquela espécie (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>) (McGIRT *et al.*, 2002). Como antioxidantes não enzimáticos apresentam destaque a glutathione (GSH), os polifenóis, principalmente flavonóides, algumas vitaminas e minerais (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009). A bilirrubina é apontada também por suas propriedades antioxidantes, especialmente quando está em sua forma covalentemente ligada à albumina, seu principal transportador sérico (CONDEZO-HOYOS, *et al.*, 2009). Esta forma de bilirrubina é conhecida como δ-bilirrubina ou biliproteína (YOSHIDA *et al.*, 1987). Diaz-Gil e Colaboradores (1988) identificaram um fator de crescimento do fígado como sendo uma δ-bilirrubina que exerce propriedades regenerativas e antifibróticas. É proposto por Condezo-Hoyos e Colaboradores (2009) que essas propriedades sejam exercidas por mecanismos de ação antioxidante, pois o fator mostrou-se efetivo como sequestrador de radicais peroxil, hidroxil e superóxido em baixas concentrações molares, aumentando a vasodilatação, reduzindo a PA e fibrose.

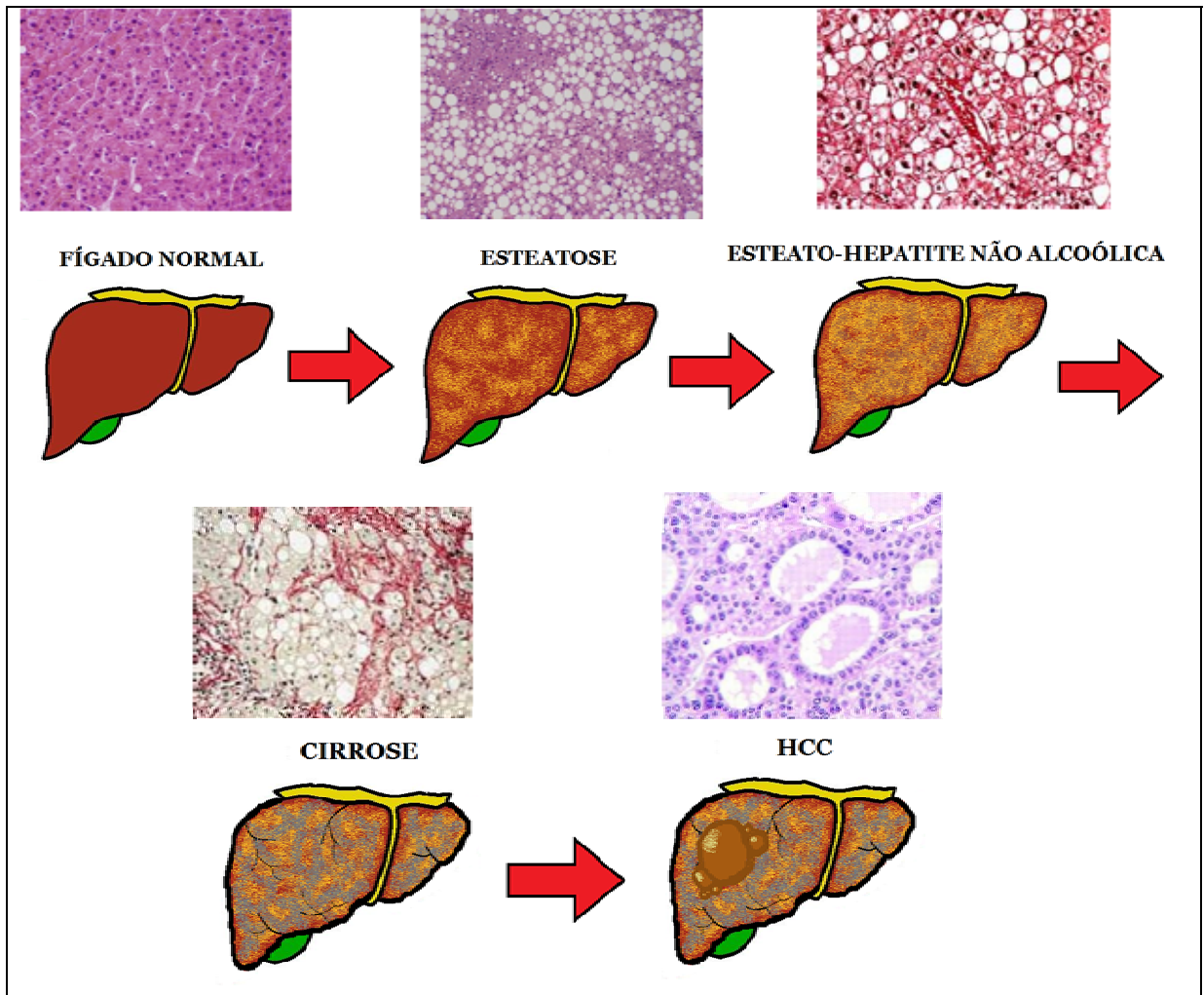
Interessantemente, baixas concentrações séricas de bilirrubina foram associadas à DCV. A albumina também pode exercer atividade antioxidante, como sequestrador de radicais livres e através da quelação de cobre e ferro que são metais que podem estar envolvidos na propagação de peroxidação lipídica através da reação de Fenton ( $\text{Fe}^{++} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{O}_2^{\cdot-}$ ;  $\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$ ) (ROCHE *et al.*, 2008). Por outro lado, Condezo-Hoyos e Colaboradores (2009) não observaram atividade antioxidante da albumina contra radicais hidroxil, mas atribuem o resultado como provavelmente relacionado às baixas concentrações utilizadas.

### **2.3 Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas como componente da síndrome metabólica**

As DHGNA apresentam-se como agravos hepáticos caracterizados pelo acúmulo de gordura no órgão não atribuível ao consumo alcoólico ou a outras causas conhecidas de doença hepática, compreendendo a um amplo espectro de doenças de infiltração gordurosa. Inicialmente, tem-se a esteatose simples que pode evoluir e/ou coexistir com a inflamação, sendo, assim, denominada esteatohepatite não alcoólica (EHNA). Em uma sequência fisiopatológica, tem-se a cirrose, necrose e, por fim, hepatocarcinoma hepático (Figura 4). Tais agravos são apontados como responsáveis por 33 % dos casos de cirrose criptogênica, ou seja, aquelas de causa não estabelecida (PAGANO *et al.*, 2002; FESTI *et al.*, 2004).

Dados da literatura apontam para prevalências de algum grau de infiltração gordurosa hepática na ordem de 20 % na população em geral (ARAYA *et al.*, 2006) e aproximadamente de 70 a 90 % em indivíduos portadores de obesidade ou DMII (TARGHER, 2007). É conveniente lembrar que as taxas percentuais destes agravos,

similarmente às de SM, apresentam variações decorrentes das diferenças entre os desenhos metodológicos dos estudos e às variáveis geográficas das populações estudadas (BROWNING & HORTON, 2004; KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007). Jimba e Colaboradores (2005) apontam prevalências de 29 % em japoneses adultos aparentemente saudáveis de meia idade, independentemente associada ao prejuízo no metabolismo de glicose. É visto que, mesmo populações orientais, que já foram apontadas por menores taxas de doenças crônicas, apresentam-se atualmente acometidas por distúrbios metabólicos. Fan e Colaboradores (2005) indicaram risco de fígado gorduroso aumentado em 32, 31, 22, 23 e 39 %, respectivamente, em indivíduos com obesidade abdominal, diabetes, dislipidemia, hipertensão e SM. A prevalência destes agravos aumenta com a idade, presença de DMII, obesidade e hipertrigliceridemia. Somando-se ao exposto, a alanina aminotransferase (ALT) também se apresenta como marcador, depois de excluídos os demais fatores de risco (BEDOGNI *et al.*, 2005). Entretanto, estudos populacionais precisam ser conduzidos para melhor estimar estes apontamentos. Outros relatos indicam prevalência de SM de 65 % entre indivíduos acometidos por DHGNA (RYAN *et al.*, 2005). Nas populações dos Estados Unidos e Ásia a estimativa é de que 2 a 10 % das crianças sejam acometidas por DHGNA (PAPANDREOU *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Fotos ilustrativas e representação esquemática do comprometimento hepático na evolução da doença hepática gordurosa não alcoólica. HCC: hepatocarcinoma (Adaptado de DAY, 2002).

Inúmeras descrições associaram a DHGNA à obesidade. Poniachik e Colaboradores (2002) apontaram taxas de 91, 45, 47 e 1,4 %, respectivamente, de obesos mórbidos com diagnóstico de esteatose, esteatohepatite, fibrose e cirrose. De fato, cerca de 70 a 90 % dos indivíduos obesos, submetidos a avaliações específicas, apresentam-se com algum grau de infiltração gordurosa, sendo a obesidade um fator de risco, bem como um dos componentes da síndrome metabólica. Contudo, os não obesos podem também apresentarem algum destes agravos hepáticos, além de serem resistentes à insulina e, assim, diagnosticados, dessa forma, como portadores de SM. Ou seja, a síndrome pode manifestar-se em indivíduos sem aumento da circunferência abdominal, porém com algum depósito de gordura visceral



(FONSECA, 2008).

Estudos apontam que a presença de um fígado gorduroso está correlacionada linearmente com todos os componentes da SM, independente da obesidade, sendo, portanto, apontada como o componente hepático da mesma (MARCEAU *et al.*, 1999). Corroborando esses achados, o mais importante não é a quantidade, mas a qualidade da alimentação ingerida. Magreza ou IMC dentro da normalidade não impedem a existência de complicações metabólicas tão graves quanto aquelas apresentadas no perfil para SM. Portanto, a avaliação do fenótipo corporal, através dos parâmetros de normalidade para IMC e relação cintura quadril (RCQ), não deve ser tomada como componente isolado de investigação (ÁVILA, 2004).

Estudos demonstram que 20 a 30 % dos indivíduos com esteatose evoluem para cirrose dentro de 20 anos, o que potencialmente leva a falência hepática e hepatocarcinoma. Dentre os pacientes com diagnóstico de infiltração gordurosa hepática, os percentuais de outros achados histológicos é elevado, a exemplo do estudo de Araya e Colaboradores (2006). Neste, os autores encontraram apenas 17,4 % de esteatose “pura” comparados com 78,3 e 50 % com esteatohepatite e fibrose. Outros estudos estimam que aproximadamente 50 % dos pacientes com EHNA desenvolvem fibrose, 15 % desenvolvem cirrose e 3 % progridem para falência hepática terminal, necessitando de transplante hepático (MARCHESINI *et al.*, 2001). Assim, a esteatohepatite é caracterizada por infiltração macrovesicular, inflamação lobular, balonização de hepatócito e fibrose, especialmente pericelular na região centrolobular ou zona 3 (MANTENA *et al.*, 2008).

A hipótese de dois “hits” é amplamente aceita como teoria da evolução das DHGNA. Neste caso, um “hit” corresponde ao ponto de mudança entre uma etapa e outra na evolução do agravo. Segundo esta teoria, o primeiro “hit” corresponde ao acúmulo de triglicerídeos no hepatócitos, sendo corresponde à esteatose. Esta poderia envolver,

suprimindo-se o agente causal, ou progredir para outras doenças hepáticas do espectro de DHGNA a partir do segundo “hit”. Este, por sua vez, pode ser desencadeado por estressores ambientais como dieta, fumo, poluentes, ou estressores metabólicos como hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia que se caracterizam como fatores capazes de induzir estresse oxidativo (DAY, 2002). Dessa forma, o fígado torna-se mais sensível a agressões na presença de esteatose (MANTENA *et al.*, 2008). Além disso, existe a possibilidade de se desencadear a resposta patológica devido à lipotoxicidade (FARREL & LARTER, 2006).

Sabendo-se que o fígado está no centro do metabolismo de macro e micronutrientes, da depuração de substâncias tóxicas, da síntese de proteínas, de bile, de fatores de coagulação e do armazenamento de moléculas é notório que alterações patológicas neste órgão podem ter grandes e relevantes repercussões para a manutenção homeostática e da qualidade da vida, cujas consequências variam de acordo com a causa, a intensidade e a duração da exposição a fatores agressivos (MAIO *et al.*, 2000). No caso específico das DHGNA, o contexto local e sistêmico das agressões concorrentes na síndrome metabólica, como persistente e gradativa infiltração gordurosa, decorrente da alteração do metabolismo lipídico e glicídico, e acúmulo de substâncias inflamatórias, podem determinar o agravamento do comprometimento hepático e, desta forma, levar a alterações nas funções do órgão.

A fisiopatologia da SM está fortemente associada à resistência à insulina (RI) com o envolvimento de fluxo excessivo de ácidos graxos (Figura 5). Dessa forma, as anormalidades metabólicas incluem intolerância à glicose, RI, obesidade central, dislipidemia e hipertensão (ECKEL *et al.*, 2005). A hiperinsulinemia e a resistência à insulina têm sua origem principal na secreção pancreática compensatória em resposta à reduzida sensibilidade insulínica apresentada nos órgãos periféricos e não na liberação hepática do hormônio reduzida (PAGANO *et al.*, 2002). Destaca-se que o estado pró-inflamatório consequente às

anormalidades metabólicas desenvolvidas, contribui de maneira decisiva para com o perfil sindrômico.

Estudos apontam uma relação entre a RI e a esteatose hepática, independentemente da existência de adiposidade. Sugere-se, que este agravo hepático pode ser um marcador precoce de diminuição na sensibilidade à insulina, independente de adiposidade visceral. Desta maneira, considera-se a possibilidade de existência da SM sem elevação da circunferência abdominal (HSIAO, 2007). Sabe-se ainda que a ação da insulina sobre os fatores de crescimento pode promover a formação de matriz extracelular e determinar a progressão da fibrose. Além disso, o aumento do fluxo de ácidos graxos, da peroxidação mitocondrial e assim, do estresse oxidativo hepático, estariam modulando as funções das células de Kupfer através da ativação de fatores de transcrição que, por sua vez, aumentam a expressão de genes relacionados com mediadores pró-inflamatórios e fibrogênicos (ARAYA *et al.*, 2006).

Com relação ao acúmulo celular de lipídeos, este pode resultar de um desbalanço entre a formação das gotículas de gordura e a hidrólise destes lipídeos pela lipase hormônio sensível (LHS) e LPL (HOLM *et al.*, 2000) (Figura 5). Além disso, o fígado gorduroso (FG), em geral, apresenta-se com resistência à insulina, o que pode contribuir para o agravamento do estado metabólico do indivíduo portador, com aumento do risco de doença cardiovascular, DMII e doença hepática avançada, especialmente pela exacerbação na produção de glicose, VLDL, CRP (“reactive C protein”; proteína C reativa) e fatores de coagulação. Somando-se a isso, altos níveis de CRP podem ser sinônimo de excesso de citocinas e estado pró-inflamatório. Já elevados níveis de PAI-1 (“plasminogen activator inhibitor 1”; inibidor do ativador de plasminogênio 1) podem contribuir para um estado pró-trombótico. Por outro lado, baixos níveis de adiponectina são relacionados à piora dos fatores de risco metabólicos (GRUNDY *et al.*, 2004).

Neste contexto, a distribuição corporal de tecido adiposo pode ser o mais importante foco de investigação das alterações metabólicas associadas. O acúmulo deste tecido tem sido associado à RI, a um aumento de atividade inflamatória, dislipidemia e distúrbios cardiovasculares. Desta maneira, este depósito adiposo pode fazer parte da patogenia da SM (FONSECA, 2008), através da liberação de vários produtos que podem exacerbar os fatores de risco, conforme descrito.

A partir das premissas anteriormente citadas, observa-se que cada fator de risco para SM pode apresentar uma regulação própria que, por sua vez, modula-se de acordo com fatores genéticos e adquiridos. Grundy e Colaboradores (2004) exemplificam essa situação apontando como o metabolismo das lipoproteínas é amplamente modulado pela variação genética e como o avanço da idade pode contribuir para o agravamento dos níveis de patogênese.

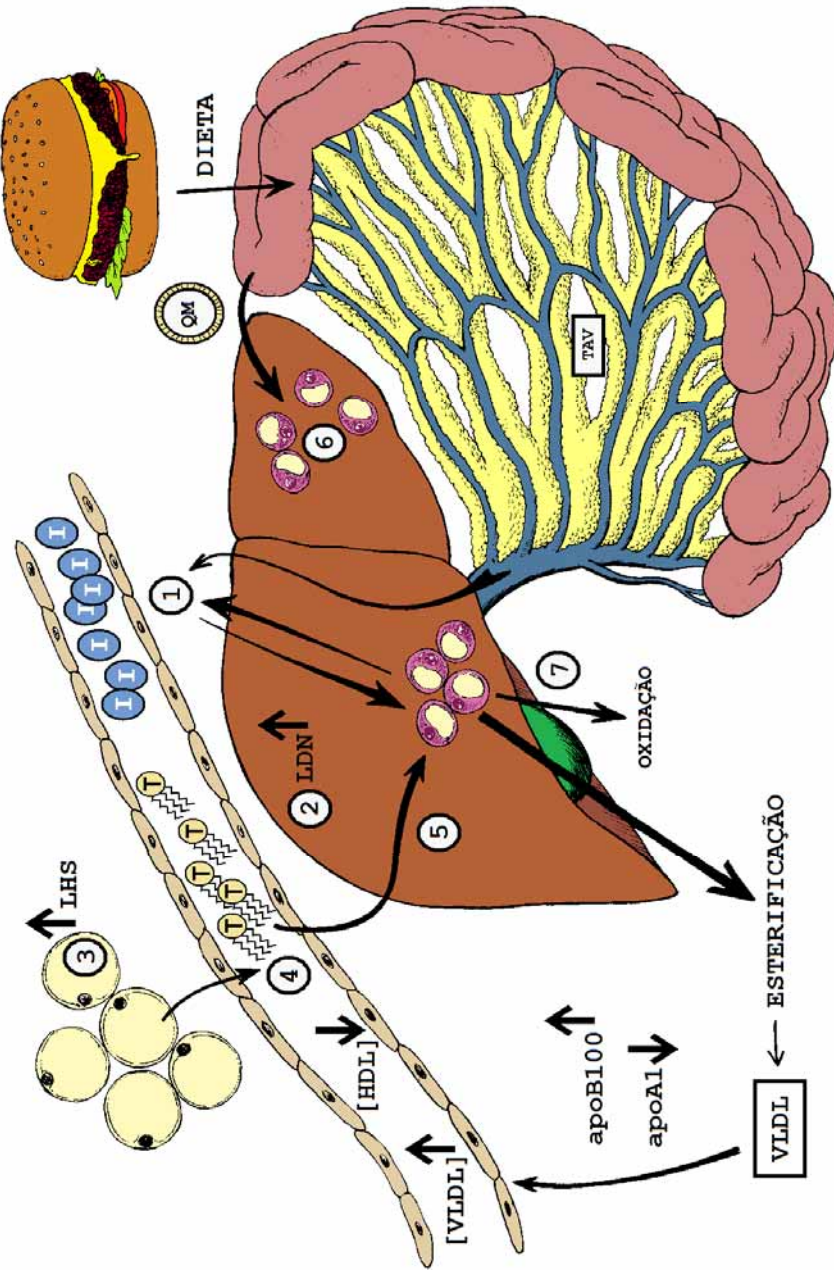
A infiltração gordurosa é uma resposta comum a diversos tipos de agressão como hipóxia, toxinas, inflamação sistêmica, câncer, inanição e transtornos metabólicos. Entretanto, ainda é considerada uma condição benigna, desde que a causa, a intensidade e o tempo de exposição não tenham sido suficientes para desencadear a evolução do processo de infiltração. Neste caso, esta agressão pode ter participação na evolução para fibrose, cirrose e até falência hepática, através, especialmente, do estímulo ao acúmulo de substâncias pró-inflamatórias, que desencadeiam a esteatohepatite não alcoólica. Além disso, a presença de infiltração gordurosa pode interferir nas funções hepáticas de detoxificação e metabolismo de drogas (MARCEAU *et al.*, 1999).

Ao fator genético é atribuída a possível explicação para o fato de que alguns indivíduos acometidos por infiltração gordurosa progridem para esteatohepatite e outros não (SIMS, 2001). Segundo Danforth (2000), quanto maior a capacidade do indivíduo de armazenar gordura no tecido adiposo, maior poderia ser o mecanismo protetor para o acúmulo

dessa gordura em outros tecidos tais como o fígado. Assim, a EHNA, em geral, apresenta-se sob a forma de lesões necro-inflamatórias associadas à esteatose (ZAFRANI *et al.*, 2004).

As DHGNA têm sido associadas aos efeitos de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 (interleucina-6) e TNF- $\alpha$  (“tumoral necrose factor  $\alpha$ ”; fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) por mecanismos ainda pouco conhecidos. Entretanto, sugere-se que TNF- $\alpha$  induza RI por aumento na fosforilação no resíduo de serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1; “insulin receptor substrate”). Além disso, outras citocinas pró-inflamatórias também estimulam a produção de moléculas supressoras de sinalização, (SOCS; “suppressors of cytokine signaling”). Assim, a supressão de SOCS melhora a esteatose hepática, principalmente, pela normalização da expressão da proteína ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1; “sterol regulatory element-binding protein”), enzima chave na regulação da síntese de ácidos graxos no fígado. Além disso, uma produção exacerbada de ácidos graxos e a lipotoxicidade resultam em aumento da RI, criando um ciclo característico da SM (UEKI *et al.*, 2004).

**Figura 5.** Principais mecanismos envolvidos na patogenia das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas pela diminuída ação da insulina, característica de resistência insulínica (RI). Hiperinsulinemia associada à RI local (1) estimula a lipogênese de novo (LDN) hepática (2), elevando o acúmulo de triglicerídeos no fígado (5) e a lipase hormônio sensível (LHS) no tecido adiposo (3) estimulando a liberação de ácidos graxos livres na circulação (4) e assim uma captura hepática (5). O acúmulo hepático de gordura pode ser ainda acentuado pela captura dos lipídeos que chegam ao tecido a partir da alimentação, através dos quilomícrons (QM) (6) e da circulação portal, associada ao tecido adiposo visceral (TAV), o que pode aumentar ainda mais o estado de RI. Por outro lado, a capacidade oxidativa hepática pode ter seus limites excedidos (7) e assim os triglicerídeos são prioritariamente esterificados, compondo as frações de lipoproteínas. VLDL é apontada como iniciadora de alterações no metabolismo de apoproteínas com elevação nas concentrações de ApoB100 e diminuição de ApoA1, associadas diretamente ao conteúdo circulante das frações de VLDL e HDL, respectivamente. (Adaptado de PAGANO et al., 2002; FONSECA, 2008.).



Ácidos graxos livres (AGLs) são tóxicos aos hepatócitos por desregularem o metabolismo lisossômico e induzirem o estresse no retículo endoplasmático. Estes eventos resultam em apoptose celular (MANTENA *et al.*, 2008). Excesso de ácidos graxos no fígado pode ser resultado de uma ou da combinação de várias alterações metabólicas: diminuição da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no fígado; aumento na síntese de ácidos graxos devido à estimulação de vias lipogênicas; aumento da liberação de ácidos graxos do tecido adiposo pela lipólise; inibição da exportação de VLDL-TG. Segundo Tamura & Shimomura (2005), a captura de ácidos graxos pelo fígado não é regulada de acordo com a quantidade acumulada, sendo a concentração plasmática relacionada ao influxo desses ácidos para este órgão. Na RI, a insulina falha em sua ação de suprimir a atividade da lipase hormônio sensível o que resulta em lipólise e aumento do fluxo de ácidos graxos para o *pool* plasmático, semelhante ao que ocorre no estado de jejum (Figura 5). A continuidade no fluxo ao fígado de ácidos graxos associada à diminuição da ação da insulina sobre a lipólise estimula uma maior produção de glicose no fígado e síntese de VLDL. Decorrente da RI, a lipase lipoprotéica diminui a atividade, diminuindo a depuração plasmática e permitindo a troca de componentes das partículas de HDL de colesterol para triglicerídeos. Este evento acarreta em prejuízo no transporte reverso de colesterol e produz partículas menores de LDL (ADIELS *et al.*, 2008).

O grau de contribuição dos ácidos graxos dietéticos para o acúmulo hepático depende do conteúdo ingerido. Musso e Colaboradores (2003) apontam que portadores de DHGNA, frequentemente, consomem maiores quantidades de gordura, especialmente de ácidos graxos saturados e que dietas com altos teores de gorduras podem aumentar a síntese hepática de ácidos graxos e induzir esteatose. Interessantemente, a via endocanabinóide apresenta um importante papel na regulação do apetite, peso corporal, metabolismo hepático de lipídeos e fibrose e, assim, é particularmente estudada nas DHGNA. Um bloqueio no receptor CB1 acaba por reduzir a ingestão alimentar. O SNAS é pois, um fator adicional que pode contribuir

para um aumentado fluxo de AGLs para o fígado e outros tecidos sensíveis à insulina (BERGMAN *et al.*, 2007).

### 2.3.1 Diagnóstico

Apesar de grande parte dos óbitos associados à SM terem associação direta com os componentes vasculares da mesma, as DHGNA têm ganhado destaque nas investigações científicas e clínicas. Contudo, semelhante aos demais componentes sindrômicos, muitas vezes apresenta-se de forma assintomática, o que pode acentuar o grau de comprometimento do órgão e, assim, do indivíduo (KOTRONEN & YKI-JÄRVINEN, 2007; QURESHI & ABRAMS, 2007), uma vez que o diagnóstico, em geral, é feito tardiamente.

Uma das grandes dificuldades de se controlar as elevadas taxas de prevalência da SM está relacionada justamente à característica silenciosa ou assintomática de seus componentes. Exemplificando, estima-se que de 20 a 30 % da população em geral apresentem algum grau de infiltração hepática gordurosa de origem não alcoólica assintomática, sendo diagnosticada ocasionalmente por métodos comuns de imagem, pois como dito, ainda não há um marcador específico para o agravo. Além disso, a baixa sensibilidade dos métodos pouco invasivos dificulta o diagnóstico (FESTI *et al.*, 2004; MEDINA *et al.*, 2004; ALLARD *et al.*, 2008). Por outro lado, os componentes da SM mais visíveis fenotipicamente são os valores elevados de CC e IMC. Entretanto, nem todos os indivíduos acometidos pela síndrome apresentam tais fenótipos (FONSECA, 2008).

Em geral, a investigação de agravos hepáticos envolve a análise sérica da atividade de enzimas marcadoras de função tecidual, especialmente alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamil



transferase ( $\gamma$ -GT), pois elevadas atividades são indicativas de lesão hepática. Assim, grande parte dos diagnósticos de DHGNA é sequencial ao achado destes parâmetros. Além disso, estes agravos hepáticos representam a causa mais comum de elevação plasmática destas enzimas (SORBI *et al.*, 2000). Contudo, tem sido descrito na literatura que estas elevações não são observadas em todos os indivíduos com diagnóstico de DHGNA (KOTRONEN & YKIJÄRVIN, 2007). Assim, estima-se que as prevalências de DHGNA sejam maiores que aquelas apontadas pela elevação das atividades séricas destas enzimas (BEDOGNI *et al.*, 2005). Por outro lado, Araya e Colaboradores (2006) constataram que indivíduos já diagnosticados com algum grau de alteração hepática, avaliados através de biópsia, apresentam elevadas taxas de ALT, AST, ALP e  $\gamma$ -GT.

Segundo Hanley e colaboradores (2005), ALT e a razão AST/ALT predizem a SM, independentemente das variáveis de confundimento, incluindo medida direta de sensibilidade à insulina e resposta aguda à insulina. Além disso, a enzima  $\gamma$ -GT, um indicador não específico, mas sensível de lesão hepática, é apontada como possível marcador de deposição visceral e hepática de gordura e assim, um possível marcador de resistência à insulina hepática, havendo significativa associação entre  $\gamma$ -GT e os componentes da SM (RANTALA *et al.*, 2000). De acordo com Wannamethee e Colaboradores (2005), o estado inflamatório hepático pode ser um dos mecanismos pelos quais as atividades de enzimas hepáticas elevadas estão relacionadas ao risco de diabetes. As enzimas ALT, AST e  $\gamma$ -GT estão frequentemente elevadas em indivíduos obesos, o que pode estar associado à presença de esteatose e esta última derivar de um efeito aumentado da insulina no fígado. A esteatose aparece quando a secreção de insulina é capaz de inibir a oxidação de ácidos graxos livres no fígado, mas não a mobilização destes do tecido adiposo. Dessa forma, elevações nas atividades séricas das referidas enzimas poderia servir como indicador clínico de RI (RANTALA *et al.*, 2000).

No tocante aos exames de diagnóstico de caráter não bioquímico, na investigação clínica tem especial destaque a ultrassonografia. Diversos estudos populacionais adotam-na como exame diagnóstico de infiltração gordurosa hepática (BEDOGNI *et al.*, 2005; JIMBA *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2005). Entretanto, estes ressaltam a necessidade da realização de biópsia hepática para a caracterização do processo patológico e o grau de comprometimento tecidual, especialmente devido ao fato de as DHGNA apresentarem características clínicas e laboratoriais semelhantes e somente a análise histopatológica pode distinguir as diversas formas de manifestação deste agravo (PAGANO *et al.*, 2002; AGA, 2002; ZAFRANI *et al.*, 2004; HANLEY *et al.*, 2005). Assim, por esta análise é possível identificar e quantificar o grau de infiltração gordurosa nos hepatócitos, o comprometimento do arranjo celular hepático, a presença de outras infiltrações como aglomerados de células de defesa tipo neutrófilos, linfócitos e macrófagos, a presença e o grau de comprometimento fibrótico tecidual, necrose celular e crescimento desordenado de células e vasos, característico de oncogênese (Figura 4).

### **2.3.2 Terapêutica**

É crescente a busca por métodos diagnósticos precoces e por uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos patológicos envolvidos na SM, de maneira à melhor direcionar as ações preventivas e medidas terapêuticas (AGRAWAL & BONKOVSKY, 2002; DAY, 2002; McCULLOUGH, 2006; ADIELS *et al.*, 2008), sendo de interesse também determinar o papel das DHGNA nos estágios precoces da etiologia da SM (HANLEY *et al.*, 2005).

Relatos da literatura sugerem a possibilidade das DHGNA como mediadores precoces de DCV e seu possível papel no desenvolvimento de aterosclerose, especialmente

devido à associação dessas doenças com diversos fatores de risco para agravos cardiovasculares, independentemente de outros fatores prognósticos. Assim, as mesmas podem não ser apenas um componente da SM, mas também um possível preditor de DCV (TARGHER, 2007).

Como não há uma terapia definida para o tratamento de DHGNA, atua-se no sentido de prevenir a progressão da doença ou sua instalação. Assim, existem duas vertentes de tratamento: o farmacológico e o não farmacológico. Entretanto, na prática trabalha-se conjuntamente, ressaltando a necessidade de atuação de uma equipe multidisciplinar. Somando-se a isso, alguns relatos na literatura apontando o efeito de tratamento multifatorial nas DHGNA em indivíduos portadores de SM (ATHYROS *et al.*, 2006).

No tratamento farmacológico, os agentes que atuam na sensibilização à insulina integram a terapêutica de escolha (MARCHESINI *et al.*, 2005), podendo ser recomendado para a redução dos riscos de diabetes e doenças cardiovasculares (ECKEL *et al.*, 2005), especialmente com agonistas PPAR $\gamma$  (“peroxisome proliferator activated receptor gamma”;  $\gamma$ -receptor de proliferador de peroxissoma ativado) e terapia insulínica. Para o tratamento da obesidade não há recomendação de uso rotineiro de fármacos. Dessa forma, a principal estratégia é a perda de peso associada à dieta e exercícios físicos; o tratamento farmacológico deve ser empregado com cautela (LOPES, 2007).

Para a hipertensão arterial são empregados os mesmos agentes farmacológicos utilizados no tratamento da hipertensão essencial; a terapêutica de escolha está mais associada à presença de comorbidades (GRUNDY *et al.*, 2004). Se o DMII está presente, a terapêutica também é direcionada para a melhora da resistência à insulina. Já no tratamento da dislipidemia, os hipolipemiantes estão indicados quando a intervenção não farmacológica não pode alcançar os efeitos desejados. Assim, dentre os fármacos mais utilizados, encontram-se as estatinas, que atuam, principalmente, através do aumento da atividade dos receptores de

LDL reduzindo os níveis plasmáticos destas frações, podendo contribuir para a correção do metabolismo dos quilomícrons (GINSBERG, 2006). Além destes, destacam-se os fibratos, que podem contribuir diretamente na modificação da dislipidemia aterogênica (GRUNDY *et al.*, 2004).

A partir de uma exaustiva revisão bibliográfica, observa-se que para o comprometimento do componente hepático não há um tratamento específico (GRUNDY *et al.*, 2004; ECKEL *et al.*, 2005; MARCHESINI *et al.*, 2005; ARAYA *et al.*, 2006; GINSBERG, 2006). Interessante, Furukawa e Colaboradores (2004) sugerem que o estado redox do tecido adiposo pode ser um alvo terapêutico potencialmente útil na SM associada à obesidade. Corroborando estes autores, Choi e Colaboradores (2008) apontam, em uma revisão literária, os possíveis efeitos antioxidantes de drogas usadas no tratamento de DMII e sua atuação sobre o EO, bem como a possibilidade de drogas antihipertensivas atuarem de maneira similar. Somando-se a isso, entre as suas ações pleiotrópicas, as estatinas também têm sido reputadas por seus efeitos antioxidantes (GINSBERG, 2006).

A partir do exposto, o que se observa na literatura que descreve a cerca do tratamento dos componentes da SM é que a abordagem não farmacológica compõe o primeiro procedimento terapêutico. Dessa forma, a perda de peso e as modificações no estilo de vida formam o principal modo de intervenção com a necessidade de realização de exercícios orientados e acompanhamento nutricional (ECKEL *et al.*, 2005). É relevante destacar que a perda de peso, associada a mudanças no estilo de vida, como adoção de hábitos alimentares saudáveis, aumento da atividade física, cessação do tabagismo e o controle de ingestão alcoólica, pode produzir efeitos benéficos em todos os componentes sindrômicos. Além disso, a perda de peso pode contribuir para a diminuição nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, glicose, CRP e PAI-1, aumento nos níveis séricos de HDL, melhora da PA e da resistência à insulina (GRUNDY *et al.*, 2004).

Pesquisas experimentais têm investigado os efeitos de componentes dietéticos na prevenção e/ou no tratamento das DHGNA, bem como nos demais componentes da SM. Shirouchi e Colaboradores (2008) mostraram que fosfatidilinositol dietético preveniu o desenvolvimento de hepatomegalia e esteatose hepática, além de diminuir os níveis séricos de marcadores de injúria hepática. Estes efeitos foram atribuídos ao aumento nos níveis séricos de adiponectina, aumento na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e supressão da expressão de RNAm (“ribonucleic acid”; ácido ribonucleico mensageiro) de genes de substâncias pró-inflamatórias no fígado. Resultados semelhantes foram encontrados por Yanagita & Nagao (2008). Chou e Colaboradores (2008) apontaram que a suplementação da dieta com *Alpinia pricei* pode aliviar a adiposidade visceral e resistência à insulina de modelo animal de SM. Bhatena e Colaboradores (2003) concluíram que a suplementação dietética com linhaça pode representar uma nova estratégia terapêutica na redução de hipertrigliceridemia e esteatose hepática a partir dos resultados obtidos em modelos animais de obesidade. Corroborando esses achados, Lee e Colaboradores (2007) apresentaram efetividade no controle de obesidade, hipertrigliceridemia e hiperglicemia em ratos OLETF alimentados com dieta suplementada com fenofibrato. Estes autores mostraram ainda que a combinação desta dieta com a prática de exercício físico apresentou efeito benéfico adicional.

Vários destes autores apontam a necessidade da investigação clínica de seus resultados experimentais. Em ratos Wistar, extratos polifenólicos de vinho apresentaram um efeito inibitório no estresse oxidativo hepático, após indução da esteatose hepática por dieta rica em sacarose e gordura saturada. Além disso, efeitos benéficos em outros sistemas do organismo foram observados (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009). Segundo Urquiaga e Colaboradores (2004), os antioxidantes podem reduzir ou suprimir o estresse oxidativo, dependendo do grau de comprometimento, e ácidos graxos  $\omega$ -3 protegem contra aterosclerose.

## 2.4 Modelos experimentais de DHGNA e SM

Os custos com o tratamento das doenças crônicas de causas passíveis de prevenção e, desta forma, dos diversos componentes da SM, são grandes e crescentes (OLIVEIRA, 2004). Este é um dos motivos para se buscar modelos animais que mimetizem as características humanas da síndrome de maneira a aumentar os estudos de potenciais agentes terapêuticos. Além disso, diversos componentes da SM apresentam associação direta com o comportamento dietético do indivíduo. Desta maneira, muitos dos modelos animais têm sido induzidos com base na dieta praticada pelas populações mais atingidas e avaliadas suas repercussões metabólicas (GADJA *et al.*, 2007). Neste contexto, os modelos murinos têm destaque por diversos fatores, conforme exposto (MOLNAR *et al.*, 2005; ANSTEE & GOLDIN, 2006; FITZGERALD *et al.*, 2007; CONG *et al.*, 2008). Relatos na literatura apresentam descrição de diferentes modelos murinos para estudo de SM (SONG *et al.*, 2006), assim como fazem também alusão às limitações advindas do uso destes modelos. Neste contexto, por sua susceptibilidade e pureza gênica, a linhagem isogênica C57BL/6J está entre as mais utilizadas.

Além das pressimas supracitadas, modelos animais apresentam importância fundamental nestes estudos, pois podem ter as condições genéticas e ambientais controladas, contrariamente aos aspectos éticos relacionados às investigações com humanos diante da complexidade etiológica e patogênica. Além disso, roedores alimentados com dieta *high fat* (HF) apresentam-se eficientes na reprodução de obesidade, RI e DHGNA em várias diferentes cepas e com períodos de tratamento relativamente curtos (TOYE *et al.*, 2007).

Dentre os modelos induzidos por dieta, destacam-se aqueles que fazem uso de dietas HF, ou seja, com alto teor de gorduras (SCHREYER *et al.*, 1998; BERTOLIMI, 2004; MOLNAR *et al.*, 2005; ANSTEE & GOLDIN, 2006; SHEN & BORNFEIT, 2007;

WASMUTH *et al.*, 2007), o que se aproxima muito ao padrão de consumo dietético observado entre os indivíduos portadores do agravo. Existem também os modelos induzidos por dieta deficiente em colina ou em colina e metionina. Nestes, a aumentada captura hepática de ácidos graxos e a diminuída secreção de VLDL, representam dois importantes mecanismos pelos quais estas dietas promovem acúmulo hepático de gordura (RINELLA *et al.*, 2008).

**METODOLOGIA**



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

Os animais de experimentação utilizados no presente estudo foram mantidos em condições padrão de experimentação animal recomendadas por órgãos de pesquisa animal. Para isso, o Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) conta com um espaço, o Laboratório Experimental (LE) para Camundongos, projetado especialmente para este fim com ciclo de iluminação claro-escuro automatizado de 12 horas, temperatura adequada constante, equipe técnica restrita e treinada para a manipulação correta dos animais e do espaço, condições adequadas de higienização e fornecimento de água *ad libitum*. A alimentação, independente do grupo experimental, também foi oferecida livremente aos animais.

Os procedimentos para coleta de sangue e sacrifício foram realizados da maneira mais rápida e indolor possível, evitando-se ao máximo o sofrimento dos animais. É de conhecimento e consentimento da equipe de execução do trabalho os princípios básicos para ensino e pesquisa envolvendo o uso de animais fornecido pelo próprio Comitê de Ética em Pesquisa UFAL. Desta forma, não foram previstos riscos para os animais de experimentação ou para os pesquisadores em decorrência de seu uso no presente trabalho frente aos avanços científicos que a partir dele buscou-se alcançar.

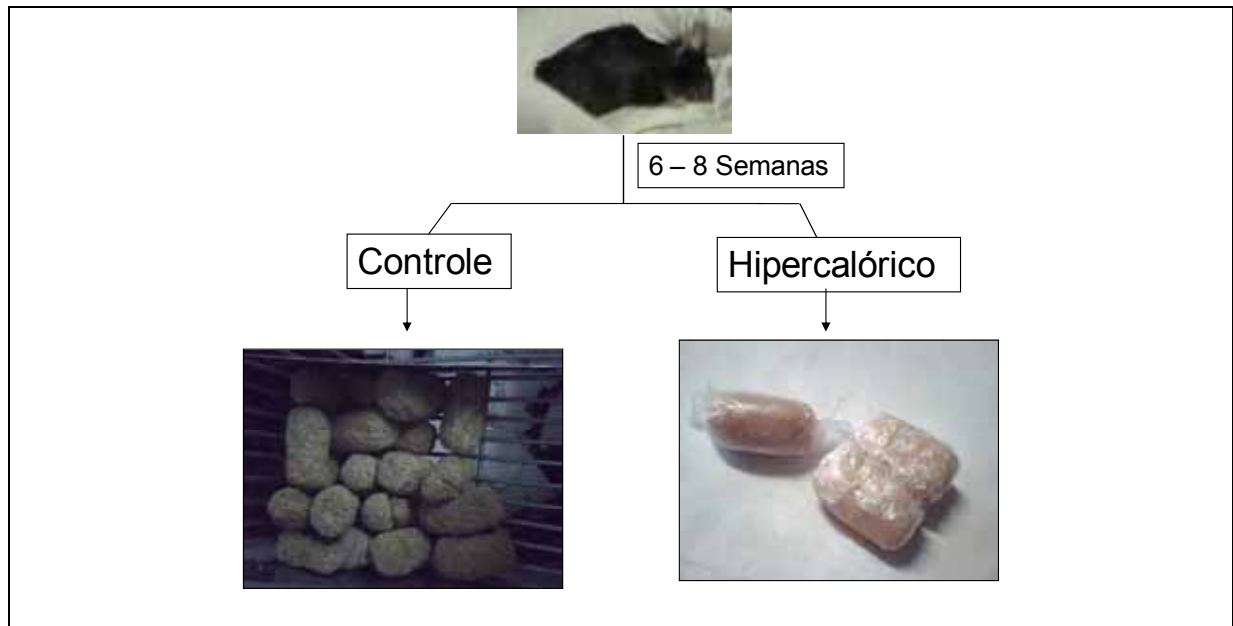
O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade de Belo Horizonte (Uni-BH), onde foi inicialmente idealizado, tendo sido aprovado (Protocolo 089).

### 3.2 Grupo amostral

Camundongos C57BL/6J machos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) foram divididos nos grupos experimentais Controle (CT) e Hipercalórico (HC), sendo compostos por, pelo menos, cinco animais cada. Os camundongos isogênicos foram desmamados aos 21 dias e receberam dieta *chow ad libitum* até a sexta semana, período de ambientação, quando foram randomicamente divididos nos grupos acima descritos. Após esse procedimento, os camundongos do grupo Hipercalórico passaram a receber dieta hipercalórica *ad libitum*.

### 3.3 Delineamento experimental

O estudo é do tipo longitudinal e foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema 2 x 1, originando dois tratamentos e, pelo menos, cinco repetições. O fator A consta de duas dietas (*chow* e hipercalórica) e o fator B de um tempo de alimentação (vinte e seis semanas).



**Figura 6.** Delineamento experimental. Camundongos C57BL/6J foram divididos randomicamente e alimentados com uma das duas dietas experimentais: *chow* (n=5) ou hipercalórica (n=6) durante vinte e seis semanas.

### 3.4 Dieta e crescimento do modelo murino

A dieta experimental hiperlipídica foi manipulada no LRC e oferecida sob a forma de “pellets”, com um período máximo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração. Os conteúdos minerais e vitamínicos foram observados de acordo com as necessidades dos animais de experimentação apontadas na AIN 93-G (REEVES, 1993). A dieta comercial utilizada pelo grupo Controle foi a Labina<sup>®</sup>. A tabela 2 descreve a composição em percentual calórico fornecida pelos macronutrientes das dietas utilizadas.

A quantidade de dieta ingerida pelos grupos experimentais foi estimada pela diferença em gramas da dieta oferecida e da sobra deixada nas gaiolas. Esta medida foi realizada a cada dois dias em balança de precisão e os valores registrados em tabela própria. O crescimento dos animais foi acompanhado através da medida do peso corporal e do comprimento tibial. O peso corporal dos animais foi averiguado em balança de precisão, tendo sido o procedimento repetido semanalmente durante todo o período de exposição

dietética, sendo respeitados os mesmos dias da semana e horários. Para a medida do comprimento tibial, após a retirada dos órgãos dos animais sequente ao protocolo de sacrifício dos mesmos, o osso tibial direito foi removido, limpo das estruturas associadas e medido com o auxílio de um paquímetro.

**Tabela 2.** Distribuição percentual calórica fornecida pelos macronutrientes das dietas *chow* e hipercalórica oferecidas aos camundongos C57BL/6J durante o período de estudo

<b>Macronutriente</b>	<b>Dieta <i>chow</i></b>	<b>Dieta hipercalórica</b>
Carboidratos (%)	63,0	26,6
Proteínas (%)	23,0	15,0
Lipídeos (%)	14,0	58,4

### **3.5 Avaliação hepática**

#### **3.5.1 Sacrifício e retirada do órgão**

No dia anterior ao do procedimento de sacrifício, os animais foram pesados. Todo o protocolo de sacrifício foi aplicado a um animal por vez, alternando-se um animal de cada grupo experimental.

Após período de jejum de 10 horas, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução composta por quetamina (100 mg/Kg) e xilamina (10 mg/Kg). Em seguida, procedeu-se a coleta de sangue por punção cardíaca, quando ocorreu o sacrifício. A cavidade tóraco-abdominal foi aberta e realizada perfusão com solução salina estéril fisiológica heparinizada através do ventrículo esquerdo. Na sequência, os órgãos foram retirados, lavados na solução acima descrita, secos em papel absorvente adequado, pesados e rapidamente congelados em gelo seco até o armazenamento em bioultrafreezer a -80 °C.

No caso específico do fígado, objeto do presente trabalho, foram realizados, após a pesagem, antes do procedimento para armazenamento, dois cortes longitudinais de aproximadamente 5 mm de espessura no lóbulo esquerdo destinado a análise histológica e reservados outros cortes para as demais análises, ou seja, exceto o tecido remanescente, o fígado foi armazenado em fragmentos de pesos conhecidos necessários às avaliações. Aqueles destinados às mesmas avaliações foram obtidos através do mesmo corte nos diferentes animais, de maneira a minimizar possíveis variações advindas de diferentes localizações do órgão. Os dados de peso do animal e do fígado foram utilizados para os cálculos de peso absoluto e relativo do órgão, contribuindo para a caracterização macroscópica do mesmo.

### 3.5.2 Análises bioquímicas

O sangue coletado, conforme descrito no subitem anterior, foi imediatamente transferido para tubo heparinizado (500 U/mL) e submetido à centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura de 4 °C. O plasma assim obtido foi cuidadosamente transferido para tubos plásticos e armazenados a -20 °C até o momento das análises.

Foram feitas alíquotas do plasma em diferentes diluições, feitas em tampão PBS 0,01 M ou solução salina 0,9 % estéreis, conforme o parâmetro a ser analisado. Avaliaram-se as concentrações plasmáticas de albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase ( $\gamma$ -GT), desidrogenase láctica (LDH), através de *kits* colorimétricos comerciais Labtest<sup>®</sup>, conforme as instruções do fabricante, para avaliação das funções hepáticas no modelo. Já a concentração de proteínas totais (PTNs) foi medida através do método colorimétrico de Bradford (1976) com leitura espectrofotométrica a 595 nm. A razão AST/ALT foi obtida pela divisão da atividade plasmática destas enzimas.

### 3.5.3 Análise do conteúdo lipídico hepático

#### 3.5.3.1 Lipídeos hepáticos totais

Para análise de lipídeos totais no tecido hepático foi utilizado o método de Folch e Colaboradores (1956). Resumidamente, aproximadamente 100 mg de tecido hepático foi triturado e homogeneizado em solução de clorofórmio:metanol ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH) na proporção 2:1. Após a adição de 400  $\mu\text{L}$  de MeOH, o homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por dez minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante reservado em tubo previamente pesado onde foram acrescentados 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  e 640  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio (NaCl) a 0,73 % e, após nova centrifugação nas condições descritas, a fase inferior foi lavada três vezes com 600  $\mu\text{L}$  de solução de Folch composta por 3 % de  $\text{CHCl}_3$ , 48 % de MeOH, 47 % de água destilada e 2 % de NaCl a 0,29 % . Após cada procedimento de lavagem, os tubos foram submetidos a novos ciclos de centrifugação e o sobrenadante desprezado. Os extratos lipídicos assim obtidos foram secos *overnight* em estufa a 37 °C e quantificados gravimetricamente em balança de precisão. Os valores obtidos foram normalizados pelo peso do tecido utilizado na análise.

#### 3.5.3.2 Triglicerídeos, colesterol total e frações no tecido hepático

Para a dosagem dos diferentes componentes lipídicos no tecido hepático, os extratos lipídicos, obtidos conforme descrito no subitem anterior, foram ressuspensos e homogeneizados em 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol.

A partir da suspensão obtida, os teores de TG, colesterol total (COL) e HDL foram mensurados através da utilização de *kits* comerciais Labteste<sup>®</sup>. Em resumo, 100  $\mu\text{L}$  de

amostra foi acrescido de 100  $\mu$ L dos respectivos reagentes fornecidos nos *kits* e após incubação por 10 minutos a 37 °C a leitura foi realizada em leitor para microplaca a um comprimento de onda de 492 nm. As concentrações destes parâmetros foram determinadas por curvas padrões a partir de diferentes concentrações de triglicerídeos e colesterol total. Utilizando as equações de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972), calculou-se as concentrações de VLDL ( $VLDL = TG/5$ ) e de LDL ( $LDL = COL - (HDL + VLDL)$ ).

### **3.6 Avaliação do estado redox hepático**

#### **3.6.1 Obtenção do homogenato hepático**

Aproximadamente 100 mg de tecido hepático proveniente de cada animal dos dois grupos experimentais, previamente armazenados em biofreezer a -80 °C, foram descongelados a 4 °C. Sucintamente, os fragmentos teciduais foram transferidos para cadinhos de porcelana e pulverizados em nitrogênio líquido. Após esse procedimento, o pó obtido foi transferido para tubos plásticos de 15 mL contendo PBS com concentrações conhecidas de inibidores de proteases (PMSF, apotininina e leupetina) e EDTA (“ethylenediamine tetra acetic acid”; ácido etilenodiamino tetra-acético). Em seguida, as amostras foram submetidas a duas centrifugações sequenciadas por 30 minutos a 4.000 rpm a 4 °C. Após esse procedimento, os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -80 °C até as mensurações.

#### **3.6.2 Medida da peroxidação lipídica**

A formação de malonildialdeído, pela quebra de ácidos graxos poliinsaturados, é um método conveniente para se determinar o grau de peroxidação lipídica. Assim, a

mensuração destes metabólitos foi realizada em microplacas através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; “thiobarbituric acid reactive substances”) de acordo com o método descrito por Wallin e Colaboradores (1993) com adaptações realizadas por Rabêlo (2004). Resumidamente, aos 100  $\mu\text{L}$  do homogenato hepático, obtido conforme descrito no subitem anterior, foram adicionados, sequencialmente, 10  $\mu\text{L}$  do antioxidante BHT (“butylated hydroxytoluene”; hidroxitolueno butilado;  $[\text{BHT}]_{\text{final}} = 5\text{mM}$ ), 1250  $\mu\text{L}$  de uma solução do ácido tiobarbitúrico a 1,3 % (Sigma<sup>®</sup>, USA). Uma curva padrão foi preparada com 190  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetra-metoxi-propano (0-7,5 nmol/L, Sigma<sup>®</sup>, USA) e 10  $\mu\text{L}$  de BHT. Em seguida, o produto da reação foi incubado a 95 °C. Após 60 minutos, a reação foi interrompida pela imersão das amostras em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, estas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor para microplacas (Thermoplate<sup>®</sup>), tendo-se como comprimento 530 nm.

### 3.6.3 Mensuração da atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada no homogenato hepático em microplaca (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca) através da utilização de *kit* comercial Fluka<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante, utilizando-se o comprimento de leitura de 450 nm (Leitora para microplacas Thermoplate<sup>®</sup>). Sucintamente, o método é baseado na utilização de um sal solúvel em água, o WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, sal monossódico), que é reduzido pelo ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). O produto desta reação é o cromógeno *formazan*. A taxa de redução é linearmente relacionada



à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD. A atividade da SOD é então expressa como porcentagem de inibição da XO pela SOD. Os dados foram normalizados pelo conteúdo tecidual protéico (Bradford, 1976).

### **3.6.4 Mensuração da atividade da catalase**

A mensuração da atividade de catalase (CAT) foi realizada em microplaca (Nunc<sup>®</sup>, Dinamarca). Sucintamente, 100  $\mu$ L do homogenato hepático foi adicionado a placa. Para o início da reação, adicionou-se 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Concentração final = 1mM). Em seguida, adicionou-se uma substância cromógena e o produto reacional foi quantificado em microplaca a 550 nm em uma leitora para microplacas (Thermoplate<sup>®</sup>). Uma curva padrão foi preparada para calcular a concentração da enzima nas amostras de homogenato de tecido hepático. Os reagentes foram preparados imediatamente antes do início da reação. A concentração de CAT foi normalizada pela concentração tecidual de PTNs medida através do método colorimétrico de Bradford (1976). Salienta-se que a metodologia utilizada foi padronizada no Laboratório de Reatividade Cardiovascular e no Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) Berlin-Buch e, no momento, encontra-se em fase final de escrita do documento envolvendo a proteção técnico-científico. Assim, os detalhes relacionados à metodologia não estão aqui expostos.

### **3.7 Análise histológica do fígado**

Os fragmentos hepáticos obtidos, conforme descrito no subitem 3.4.1, foram fixados por imersão em formalina a 10 % por, no máximo, 16 horas. Em seguida, o material

biológico foi submetido a processamento em crescentes concentrações de álcool e em xilol e então incluídos em parafina. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual, tendo-se 4  $\mu\text{m}$  como padrão para a espessura de corte. As lâminas foram montadas, em um total de quatro lâminas por animal experimental, com, no mínimo, dois fragmentos por lâmina. As mesmas foram devidamente coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise morfológica hepática e suas possíveis alterações foi realizada em microscópio óptico de luz. O registro fotográfico dos resultados foi obtido utilizando-se uma câmara fotográfica digital (7.2 megapixels, Sony<sup>®</sup>), tendo sido expressos resultados representativos por grupo experimental. Todas as técnicas de processamento e coloração foram realizadas no Laboratório de Imunohistologia (ICBS – UFAL) em colaboração com a Profa Dra Salete Smaniotto.

### 3.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de comparação entre curvas do tipo *Bonferroni*. Os demais resultados obtidos foram analisados através de teste T de *Student* não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estaticamente significativos. Os valores de “n” significam o número de animais que foram utilizados nos experimentos. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism<sup>®</sup> 4.0 (San Diego, CA, USA), respectivamente.

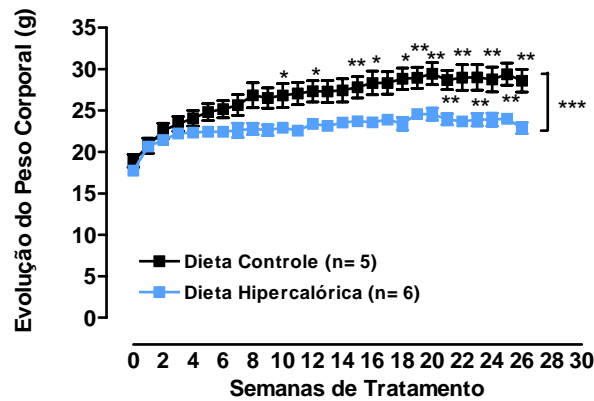
**RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

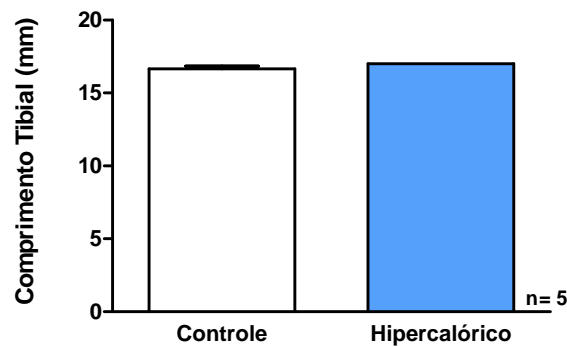
### 4.1 Dados dietéticos e crescimento dos animais

Os grupos experimentais controle (CT) e hipercalórico (HC) foram formados randomicamente, conforme descrito anteriormente. A média de ingestão dietética diária estimada dos grupos CT e HC, por animal, foi de 1,944 e 3,750 g, respectivamente. O acompanhamento da evolução ponderal dos animais durante as 26 semanas de tratamento dietético (Figura 7) foi realizado conforme exposto. A partir dos resultados obtidos, observou-se diferença significativa entre as médias de peso dos animais dos grupos a partir da décima primeira semana de exposição à dieta ( $p < 0,05$ ). Nas demais semanas de tratamento, essa diferença foi ainda maior. Na figura 7, nota-se que o peso dos animais do grupo CT manteve um aumento maior que aquele do grupo HC durante todo o período.

O crescimento animal foi avaliado pelo comprimento tibial dos animais (Figura 8). O resultado desta avaliação indica que este parâmetro, para ambos os grupos experimentais seguiu padrões semelhantes, ou seja, não foi observada diferença entre os mesmos. Desta maneira, pode-se sugerir que a diferença ponderal observada entre os grupos (Figura 7) não envolve o comprometimento no desenvolvimento animal do grupo HC, mas a uma elevação ponderal menor por este grupo durante o período.



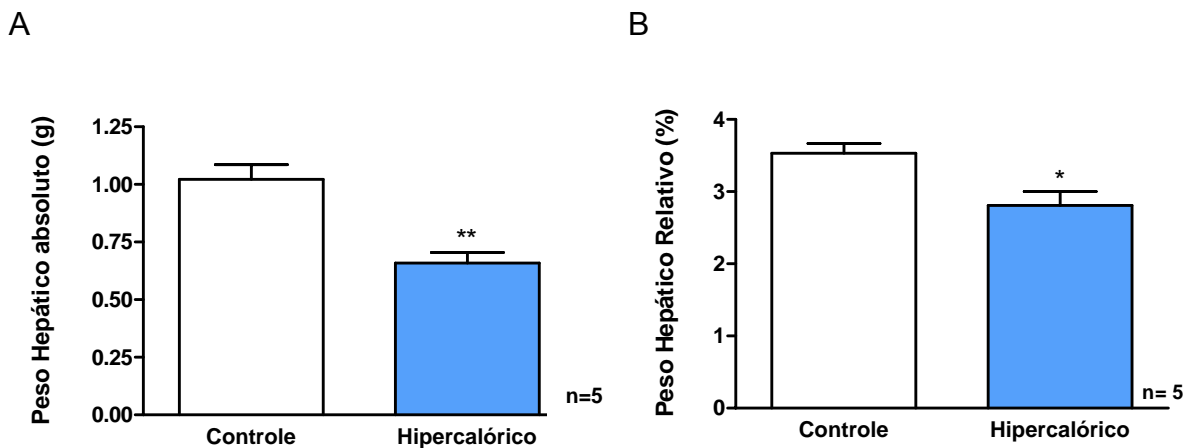
**Figura 7.** Avaliação do peso corporal dos Camundongos C57BL/6J durante 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hiperclórica. Os valores estão expressos em gramas (g) de peso corporal de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. ANOVA (duas vias) e teste de *Bonferroni*: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 8.** Avaliação do crescimento dos Camundongos C57BL/6J, através do comprimento tibial (mm), após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hiperclórica. Os valores estão expressos em milímetros (mm) e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM. Teste *t de Student* não pareado.

## 4.2 Avaliação hepática

Dentre os parâmetros utilizados na avaliação da integridade morfológica e funcional do fígado estão o peso absoluto e o relativo (Figura 9), utilizados para auxiliar na caracterização macroscópica do mesmo e avaliar um possível comprometimento funcional por perda tecidual. Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais indicando que o grupo HC apresentou menor desenvolvimento hepático, o que por si só já pode representar prejuízo funcional.



**Figura 9.** Peso absoluto e relativo ao peso corporal do fígado dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em gramas (g) e percentual (%), respectivamente, e representam, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. Teste *t* de Student não pareado: \* $p < 0,05$ .

### 4.2.1 Avaliação plasmática de marcadores de função hepática

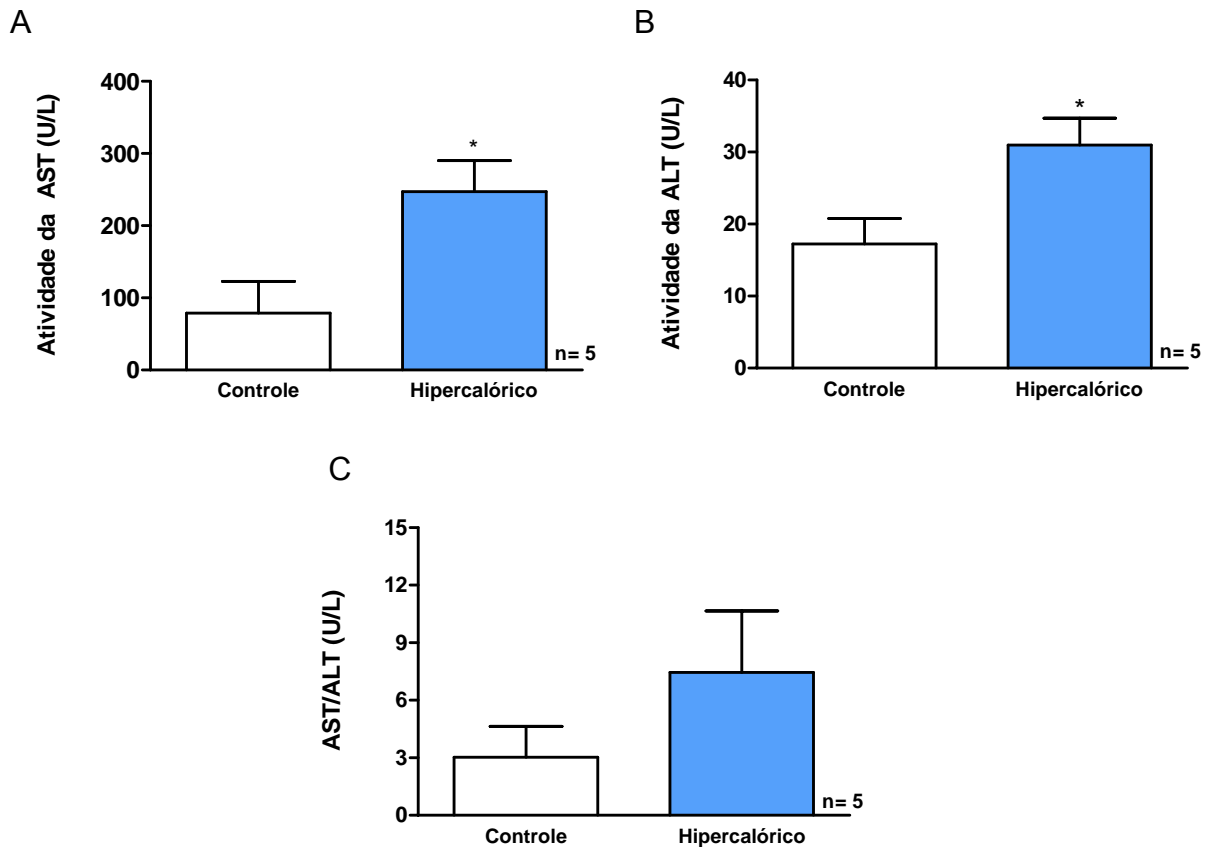
As análises das funções hepáticas foram realizadas por meio de avaliações bioquímicas no plasma dos animais, tratado conforme descrito no subitem 3.4.2.

A enzima ALT é o marcador de lesão hepática mais específico, sendo a sua produção e atividade associadas estreitamente a função do fígado. Em casos de lesão nos

hepatócitos, esta aminotransferase é liberada na circulação em níveis aumentados sugerindo a referida lesão. Em relevância, é seguida pela AST como marcador de agravo hepático. Contudo, esta última também é investigada em outros casos de lesão tecidual, a exemplo da miocárdica aguda. Os resultados obtidos na avaliação destas aminotransferases (Figura 10) apontam lesão hepática nos animais do grupo HC. As diferenças encontradas entre os grupos CT e HC foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Foi verificada a relação entre as atividades de AST e ALT através de sua razão (Figura 10). Contudo, não houve diferença entre os grupos.

A atividade dos demais marcadores de função hepática avaliados encontra-se expressa na Tabela 3. As análises indicaram atividades de ALP estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais, sendo maiores no HC, confirmando os dados observados para AST e ALT, uma vez que aumentos significativos na atividade desta enzima são encontrados na doença hepática em geral. A atividade da enzima  $\gamma$ -GT foi muito baixa em ambos os grupos experimentais, ainda assim, observou-se diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo o resultado do grupo HC maior. A baixa atividade e a variabilidade observada nos grupos contribuiu para a observação dos valores obtidos no grupo CT.

Para a LDH, não se evidenciou diferença significativa entre os grupos. Dentre as enzimas investigadas, esta enzima apresenta-se como a menos específica na investigação de doença hepática, pois, em geral, são observados apenas pequenos aumentos associados à cirrose, hepatite e icterícia. As concentrações plasmáticas de albumina e PTNs não apresentaram diferença nas análises realizadas (Tabela 3).



**Figura 10.** Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (B), marcadoras de função hepática, no plasma dos Camundongos C57BL/6J, em U/L, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em unidade enzimática por litro de analito (U/L), isto é, quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e representam cinco animais por grupo experimental. (C) Razão AST/ALT (aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase), indicador de lesão e grau de comprometimento hepático nas mesmas condições experimentais. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ .

**Tabela 3.** Atividades plasmáticas de marcadores de função hepática através da análise bioquímica de fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase ( $\gamma$ -GT), desidrogenase láctica (LDH) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica.

Parâmetro	Grupo CT	Grupo HC	Resultado estatístico
ALP (U/L)	1,66 $\pm$ 2,43	12,30 $\pm$ 2,16	$p < 0,01$
$\gamma$ -GT (U/L)	-9,192 $\pm$ 7,93	0,884 $\pm$ 1,22	$p < 0,05$
LDH (U/L)	5,19 $\pm$ 15,96	14,87 $\pm$ 11,50	NS
Albumina (mg/mL)	10,47 $\pm$ 2,52	10,08 $\pm$ 0,96	NS
PTNs (mg/mL)	74,06 $\pm$ 5,99	88,66 $\pm$ 2,50	NS

ALP (fosfatase alcalina),  $\gamma$ -GT (gama glutamiltransferase), desidrogenase láctica (LDH). U/L: unidade enzimática por litro de analito, quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitrofenol, p-nitroanilina e NADH, respectivamente. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM obtidos de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

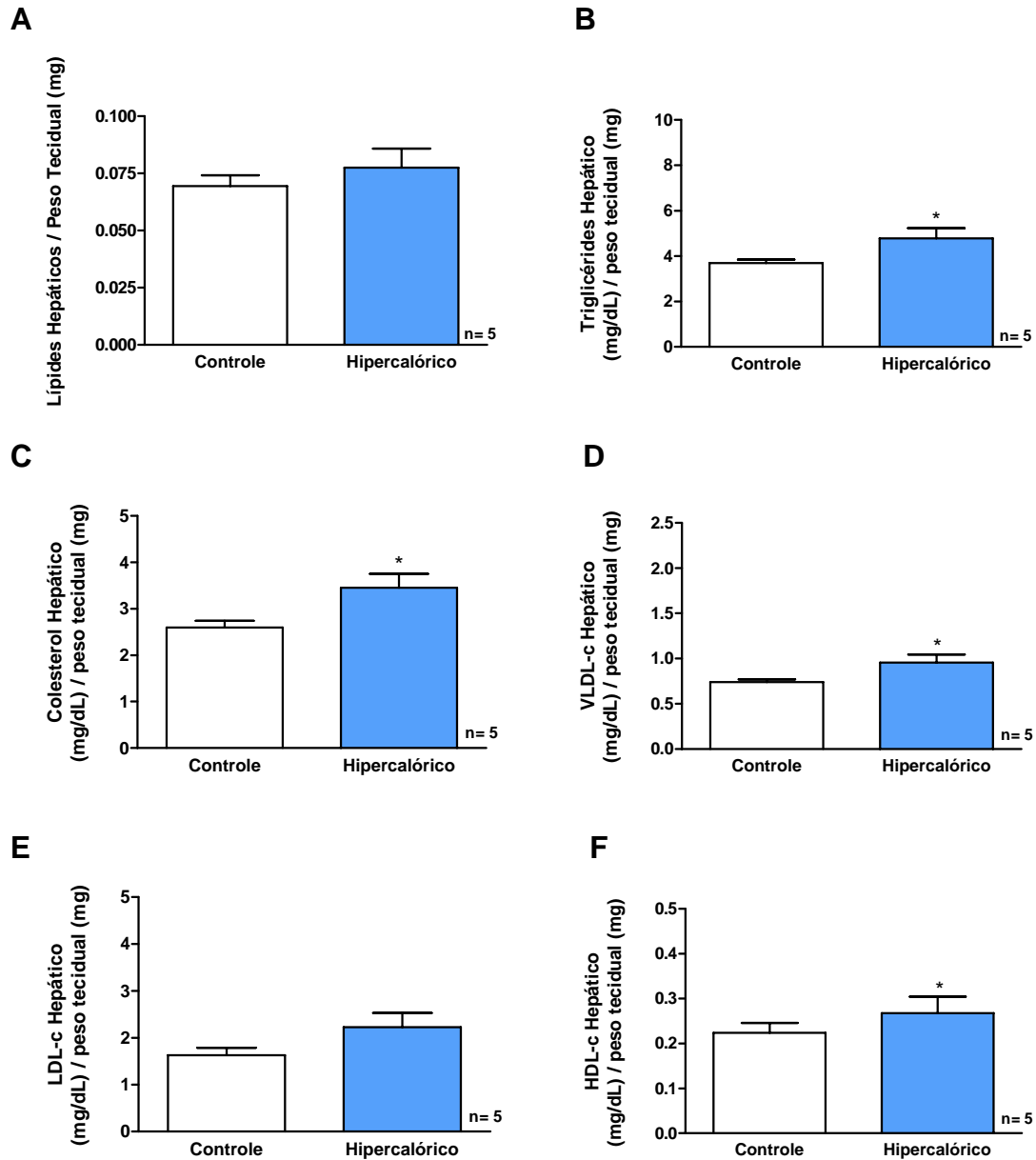


#### 4.2.2 Análise do conteúdo lipídico hepático

A composição lipídica do tecido também foi investigada (Figura 11). Para isso, utilizou-se o método descrito de Folch e Colaboradores (1956) para a obtenção do conteúdo lipídico hepático total e dos extratos para análise dos demais componentes teciduais.

Com relação ao teor lipídico total, os resultados observados não apresentaram diferença entre os dois grupos experimentais (Figura 11A). Os parâmetros TG, COL e HDL foram medidos na suspensão dos extratos em isopropanol conforme descrito. Os resultados obtidos apresentaram-se estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), sendo maiores nos animais HC.

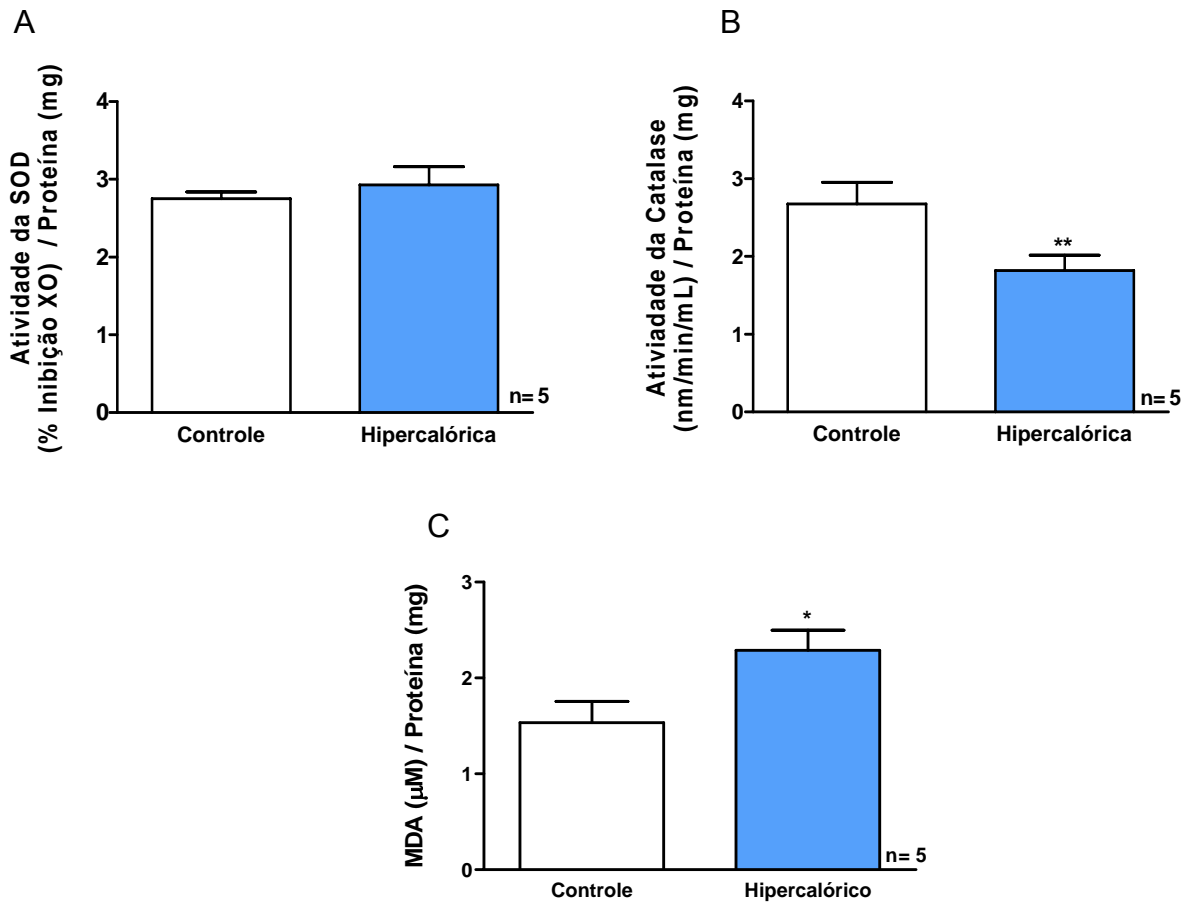
A partir dos resultados, foram calculadas as concentrações de VLDL e LDL no tecido hepático através das equações de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972). No parâmetro LDL, não foi observada diferença entre os grupos experimentais. Já a avaliação da concentração da fração VLDL apresentou-se aumentada no grupo HC.



**Figura 11.** (A) Conteúdo lipídico total no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg por mg de peso tecidual. (B, C e D) Concentrações observadas no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg/dL, de triglicérides, colesterol total, HDL, LDL e VLDL, respectivamente, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hiperclórica. Os valores estão expressos em miligramas por miligramas de tecido e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ .

### 4.3 Estado redox hepático

O estado redox hepático foi avaliado a partir da atividade das enzimas SOD e catalase e da medida da peroxidação lipídica tecidual. Os resultados de SOD e CAT foram normalizados pela concentração de PTNs no homogenato de tecido hepático, conforme descrito anteriormente. Como pode ser observado (Figura 12A), a atividade da SOD, medida como porcentagem de inibição da enzima xantina oxidase (XO), não apresentou diferença entre os dois grupos experimentais. Por outro lado, a atividade da catalase, expressa em unidade enzimática, mostrou-se significativamente diminuída ( $p < 0,01$ ) no grupo HC (Figura 12B), apontando para um desequilíbrio no balanço redox local. Para a quantificação dos níveis de peroxidação do tecido aplicou-se o método de detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, onde o grupo HC apresentou concentração significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) de malonildialdeído, principal produto da peroxidação (Figura 12C), o que corrobora o resultado observado na atividade da catalase para desbalanço no estado redox local.

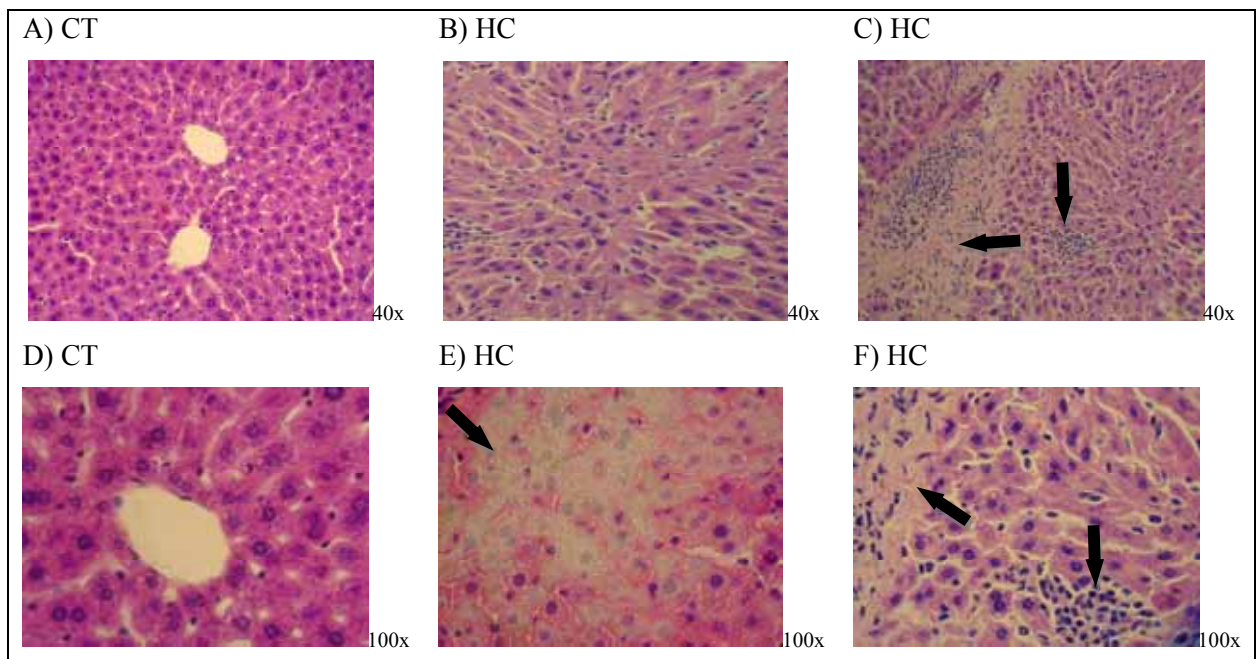


**Figura 12.** Estado redox no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. A) Atividade da SOD (superóxido dismutase) em percentual de inibição da enzima XO (xantina oxidase) por miligrama de proteína. B) Atividade da catalase em nm/min/mL normalizada pela concentração hepática de proteínas em miligrama. C) Peroxidação lipídica em concentração de MDA (malonaldeído) por miligrama de proteína. Os valores apresentados representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.4 Avaliação histológica do fígado

Para avaliação de possíveis alterações no arranjo morfológico do fígado, foram realizados cortes histológicos de 4  $\mu$ m de espessura, corados por HE (Figura 13). Percebe-se o arranjo celular normal nos cortes provenientes dos animais do grupo CT (Figuras 13A e D) com os cordões de hepatócitos, os espaços sinusoidais e portais e veia centrolobular. Já na análise dos animais do grupo HC foi evidenciado um desarranjo na estrutura do lóbulo

hepático, com células espaçadas infiltradas com pequenos vacúolos transparentes indicativos de infiltração gordurosa, vários pontos de aglomerado de células inflamatórias, focos de tecido fibrótico e regiões de características amorfas (Figuras 13B, C, E e F). Os resultados expressos são representativos dos dois grupos experimentais, compostos por cinco animais cada.



**Figura 13.** Microfotografias de cortes histológicos obtidos dos Camundongos C57BL/6J e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. As microfotografias apresentadas representam os principais achados histológicos por grupo experimental. (A e D) Histologia hepática normal do grupo Controle (CT), aumento de 40x e 100x, respectivamente. (B e C) Desarranjo da organização celular hepática, com vacuolização intracelular intensa e focos de inflamação e fibrose no grupo Hipercalórico (HC), aumento de 40x. (E) Vacuolização celular grupo HC, aumento de 100x. (F) Foco de inflamação e fibrose grupo HC, aumento de 100x.

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

A avaliação do crescimento dos animais através do acompanhamento ponderal mostrou diferença significativa entre o peso dos animais dos dois grupos experimentais acompanhados durante vinte e seis semanas, sendo que os animais do grupo HC apresentaram ganho de peso inferior comparado aos CT (Figura 7). DeLeve e Colaboradores (2008) trataram camundongos C57BL/6J por 26 semanas com dieta *high fat* (HF) ocidentalizada, para o desenvolvimento de obesidade. Se compararmos o peso dos animais do grupo controle destes pesquisadores com os observados no presente trabalho, podemos constatar que os resultados foram semelhantes (28,1 e 26,6 g, respectivamente), indicando desenvolvimento normal para a linhagem experimental. De forma contrária, o comportamento das curvas ponderais de camundongos C57BL/6J alimentados com dietas HF ou controle observado por Winzell e Ahrén (2004), foi semelhante ao aqui descrito, onde as primeiras semanas apresentam uma inclinação da curva maior, correspondente a acentuado ganho de peso, seguido, nas demais semanas, por uma desaceleração neste desenvolvimento. Biddinger e Colaboradores (2005), após dezoito semanas de acompanhamento dietético encontraram peso corporal nos animais do grupo controle bem mais elevados (41,5 g). Não há relatos na literatura de modelos de SM alimentados com dieta HF sem desenvolvimento de obesidade, semelhante ao descrito no presente trabalho, indicando a validação de um novo modelo murino para SM sem obesidade, o que pode viabilizar as pesquisas dos mecanismos fisiopatológicos desenvolvidos por indivíduos que apresentam essa mesma característica.

Para avaliar o crescimento como fator determinante para o resultado ponderal encontrado, o comprimento tibial foi mensurado e mostrou-se não significativo após a aplicação dos testes estatísticos, indicando que não houve comprometimento do crescimento dos animais HC, mas sim um menor ganho de peso ao longo do tempo. Lin e Colaboradores

(2000) estudando obesidade e desenvolvimento de resistência à leptina na mesma linhagem de camundongos realizou avaliação do comprimento tibial para averiguação do crescimento dos animais. O resultado observado também não apresentou diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que não há comprometimento de crescimento nestes animais independente do aumento de peso, quando alimentados com dieta HF.

Dados do nosso laboratório mostram que o tecido adiposo visceral (epididimal e perirenal) dos animais foi significativamente maior no grupo HC comparado ao CT (dados não mostrados). O depósito visceral de gordura é particularmente ofensivo no desequilíbrio metabólico e está mais estreitamente relacionado com RI que a obesidade corporal. Isto pode ser devido à ação de citocinas pró-inflamatórias produzidas e liberadas pelos adipócitos sobre a sensibilidade insulínica. A possível diminuição na liberação e ação da adiponectina pode estar também envolvida neste mecanismo (KASER *et al.*, 2005). Em humanos, a deposição visceral de gordura é avaliada através da medida da circunferência da cintura (CC), sendo apontada como fator de risco independente para RI, DCV e hipertensão. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesta relação ainda permanecem controversos (BERGMAN *et al.*, 2007). Além disso, segundo a teoria portal, ácidos graxos livres (AGLs) podem ser liberados do tecido adiposo visceral e terem acesso direto ao fígado através da veia portal, podendo contribuir para a deposição hepática de gordura. Somando-se estes efeitos, têm-se alterações nas ações fisiológicas da insulina (Figura 5) através, por exemplo, do aumento da produção basal hepática de glicose, o que pode acentuar a hiperglicemia. Dessa forma há a estimulação para a liberação de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, acentuando a hiperinsulinemia, característica importante da RI (ARNER, 1998; LAM *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por Bergman e Colaboradores (2007), observou-se que um aumento de dez por cento no conteúdo lipídico dietético em um modelo canino de obesidade moderada foi suficiente para induzir RI. No presente estudo, os camundongos



foram alimentados com uma dieta contendo mais de 50 % das calorias provenientes de lipídeos. Mesmo tratando-se de animais experimentais diferentes, dados do nosso grupo mostram que o modelo murino aqui estudado apresentou características associadas à RI, em especial forte intolerância à glicose (dados não mostrados). Além disso, um possível papel do SNAS no aumento do fluxo de AGL para o fígado pode ser também considerado (BERGMAN, *et al.*, 2007).

O menor ganho de peso observado nos animais do grupo HC pode induzir diferença no peso do fígado proporcionalmente a estrutura física dos animais (Figura 9A). Dessa forma, os dados de peso absoluto dos animais e dos órgãos foram utilizados para o cálculo do peso relativo, que, conforme ilustrado anteriormente nos resultados (Figura 9B), apresentou diferença significativa entre os grupos, ou seja, os animais HC apresentam menor desenvolvimento hepático, o que por si só já pode representar prejuízo funcional. Mesmo diante do fato de o fígado ter uma elevada capacidade de regeneração e de compensação funcional por parte das células não agredidas, o prolongamento em termos temporais e de intensidade de agressões celulares culminam com o esgotamento desta capacidade.

Em nosso estudo, o peso absoluto médio dos órgãos do grupo CT foi semelhante ao observado por DeLeve e Colaboradores (2008) no grupo controle com a mesma linhagem de camundongos, acompanhados pelo mesmo período de tempo e bem menor que nos animais acompanhados por Biddinger e Colaboradores (2005) por dezoito semanas, corroborando os dados apresentados por esses autores para peso corporal.

Em humanos, em geral, o fígado agredido não apresenta sinais e quando algum sintoma apresenta-se já existe um comprometimento elevado do tecido e de sua funcionalidade (COTRAN *et al.*, 2000).

Para investigar possíveis alterações funcionais do órgão foram procedidas análises bioquímicas de marcadores hepáticos (Figura 10 e Tabela 3). Ao avaliar as atividades das

enzimas marcadoras de função hepática, observou-se diferença significativa em ALT, AST, ALP e  $\gamma$ -GT, principais marcadores de lesão tecidual, indicando que houve um prejuízo funcional no órgão dos animais HC, deflagrado com aumentadas atividades dos referidos marcadores de lesão. Para  $\gamma$ -GT, observou-se muito baixa atividade da enzima nos animais do grupo controle.

Por ser prioritariamente encontrada neste órgão, a ALT é a mais específica enzima marcadora de função hepática. Lesões nos hepatócitos resultam em liberação da enzima na corrente sanguínea e por isso, atividades plasmáticas elevadas são marcadores de injúria celular. Os resultados encontrados mostram valores significativamente elevados ( $p < 0,05$ ) deste marcador nos animais HC comparados com os CT, correspondente a um aumento de aproximadamente 1,5 vezes. Estes achados corroboram com os de DeLeve e Colaboradores (2008) que observaram diferenças entre as atividades desta enzima em camundongos com obesidade induzida por dieta HF. Contudo, o aumento no grupo *high fat* foi de 12 vezes maior comparado ao controle. Acredita-se que isto possa ser devido à obesidade desenvolvida pelos camundongos, diferentemente dos animais HC do presente estudo que se apresentam como modelo de SM sem obesidade fator que pode estar envolvido no aumento do grau de infiltração gordurosa hepática e no comprometimento das funções do órgão.

Similarmente ao estudo supracitado, foram encontradas atividades plasmáticas elevadas da enzima AST, um segundo marcador de lesão hepática. Esta enzima, apesar de menos específica, é altamente sensível, semelhantemente à ALT como marcador de disfunção no fígado, onde níveis elevados são indicativos de morte celular. Em nosso estudo, observou-se um aumento superior a 2,5 vezes em relação ao grupo CT. Semelhantemente ao observado na investigação descrita para ALT, DeLeves e Colaboradores (2008) observaram diferença entre os dois grupos tratados, mas a elevação nos níveis de AST nos animais *high fat* foi cinco vezes maior. Com relação à razão AST/ALT, parâmetro amplamente utilizado na prática

clínica como indicativo do grau de comprometimento hepático, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, possivelmente devido ao fato de os aumentos nas atividades das enzimas terem sido proporcionais a ponto de não diferirem na aplicação de razão entre ambos.

As investigações das atividades plasmáticas das enzimas ALP e  $\gamma$ -GT são também utilizadas nas investigações de lesão hepática, sendo fortemente associadas à hepatotoxicidade e a lesões do trato biliar, este último aspecto mais estreitamente ligado a alterações nos níveis de  $\gamma$ -GT. Os resultados observados mostram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais para ambas as enzimas, sendo maiores nos animais HC (Tabela 3). Este resultado pode ser associado à possível lipotoxicidade advinda da alimentação com a dieta oferecida aos animais HC, na qual o percentual calórico originado de lipídeos é maior que 50 % contra os 14 % apresentados pela dieta *chow* do grupo CT.

Por outro lado, a atividade de LDH não se apresentou diferente entre os grupos. Esta enzima também é muitas vezes utilizada como marcador de função hepática, sendo, porém a menos específica entre os parâmetros enzimáticos investigados. Como pode ser observado, os níveis de PTNs e albumina apresentaram-se semelhantes entre os grupos. O resultado observado pode ser devido ao fato de que a síntese protéica foi prioritariamente mantida já que o fígado é o principal sítio deste anabolismo ou ainda que o grau de lesão tecidual não foi suficiente para desregular a síntese das mesmas. Com relação aos parâmetros lipídicos, relatos da literatura mostram que indivíduos diabéticos podem apresentar dislipidemia iniciada com alteração no metabolismo da lipoproteína VLDL, o que pode induzir a um aumento sérico de IDL e LDL. Além disso, nestes indivíduos a captura hepática de VLDL, IDL e LDL pode estar diminuída, resultando em concentrações séricas elevadas (ADIELS *et al.*, 2008). A análise do conteúdo hepático destas frações lipídicas pode ser diferente da observada nas avaliações séricas devido a estes mecanismos de efluxo e captura hepática. O conteúdo total de lipídeos hepáticos por miligrama de tecido (Figura 11A) não

apresentou diferença entre os grupos. Entretanto, os teores de TG, COL, VLDL e HDL apresentaram-se elevados no grupo HC, com diferença estatística em comparação ao CT ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o conteúdo da fração LDL não se apresentou diferente (Figura 11E), o que pode ser devido tanto a alterações no reconhecimento dessas partículas por seu receptor hepático como às alterações possivelmente sofridas no metabolismo de lipoproteínas. Para o parâmetro HDL, o resultado é compatível à alteração no catabolismo das apoproteínas onde ocorre diminuição naquela associada à fração HDL. Visto que, é descrito na literatura que as mudanças no metabolismo das lipoproteínas na SM em humanos podem ser consequentes ao aumento no catabolismo da ApoA1 e concomitante diminuição na produção desta, provavelmente devido a um mecanismo compensatório associado ao metabolismo aumentado de ApoB100, apoproteína componente das lipoproteínas VLDL, IDL e LDL, comumente elevadas plasmaticamente neste contexto metabólico (ADIELS *et al.*, 2008).

Biddinger e Colaboradores (2005) trataram camundongos C57BL/6J e 129S6/SvEvTac com dieta *high fat* e encontraram conteúdos hepáticos de triglicerídeos e colesterol aumentados em quatro e sete vezes, respectivamente. O acúmulo lipídico observado por estes autores foi confirmado histologicamente. Outro estudo, utilizando ratos Sprague-Dawley alimentados por três dias com dieta HF também apresentou conteúdo hepático de triglicerídeos significativamente aumentados com relação aos controles alimentados com dieta *chow* (SAMUEL *et al.*, 2004). A atividade da enzima glicogênio sintase foi medida por estes autores e mostrou-se que a ação da insulina sobre o aumento na atividade desta enzima estava diminuída. Além disso, observou-se nestes animais acentuada RI, indicando como a dieta pode ter seus efeitos rapidamente observados.

Na avaliação do estado redox tecidual pode ser observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de peroxidação lipídica nos animais do grupo HC, indicando desbalanço no estado redox local. Resultado semelhante foi observado por Feillet e

Colaboradores (2009) em ratos Wistar alimentados com dieta HF. Segundo Romero e Colaboradores (2008), a presença de níveis elevados de glicose sanguínea em modelos diabéticos está associada à coexistência de altos níveis de peroxidação lipídica avaliada pelo método TBARS. Em estudos realizados em nosso laboratório, a investigação dos níveis glicêmicos de jejum nos animais do grupo HC mostrou-se elevada (dados não ilustrados). Contrariamente, Furukawa e Colaboradores (2004) não encontraram alterações nos níveis de peroxidação lipídica hepática em camundongos KKAy que exibem severa obesidade, hiperlipemia e RI, quando comparados a camundongos C57BL/6 usados como controles.

Investigando-se as principais enzimas, componentes da manutenção de um equilíbrio redox, SOD e CAT, observou-se comprometimento na atividade apenas desta última. A SOD catalisa a reação de neutralização de  $O_2^{\cdot-}$ , sendo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) um produto desta reação. O estudo de Feillet-Coudray e Colaboradores (2009) não apresentou alteração na produção de  $O_2^{\cdot-}$ . Além disso, estes autores não observaram nenhuma mudança na expressão das subunidades p22phox e p47phox de NADPHox no fígado de ratos alimentados com dieta contendo altos níveis de sacarose e gordura. Resultados semelhantes foram observados por Furukawa e Colaboradores (2004) quando investigaram os níveis de expressão de RNAm para NADPHox no tecido adiposo branco de camundongos KKAy. Além disso, a atividade de SOD no estudo destes autores, semelhantemente aos resultados observados no presente estudo, não apresentou diferença quando comparados ao grupo controle. Desta maneira, é possível que o conteúdo local de  $O_2^{\cdot-}$  não seja suficiente para esgotar a capacidade enzimática de SOD. Além disso, o  $O_2^{\cdot-}$  pode reagir com espécies reativas originadas na peroxidação lipídica, como, por exemplo, com os radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), contribuindo para a diminuição local de  $O_2^{\cdot-}$ . Assim, estes eventos podem configurar

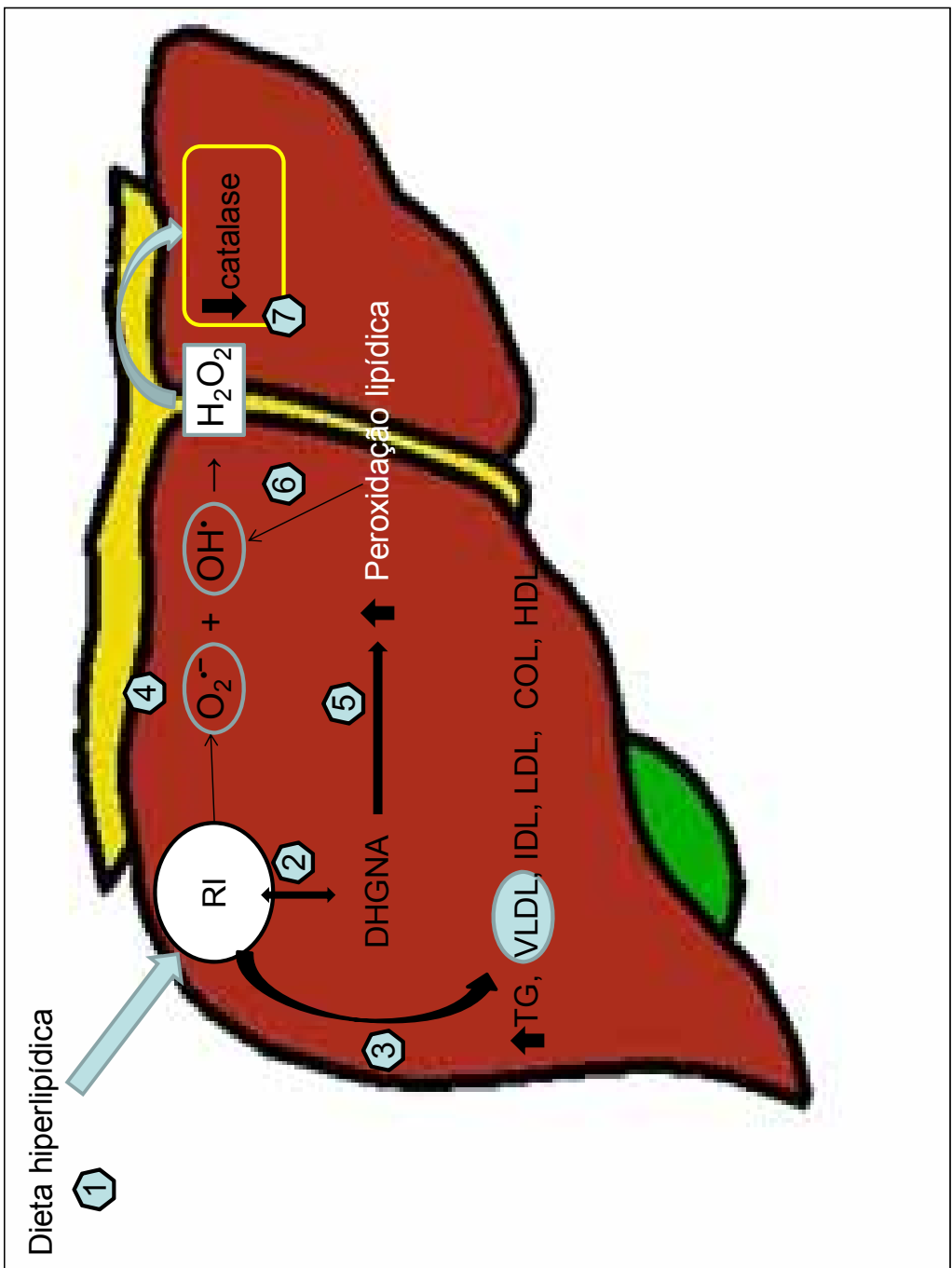
como os possíveis mecanismos pelos quais não foi observada alteração na atividade enzimática de SOD no tecido hepático do modelo investigado.

Contrariamente, a atividade da enzima catalase pode ser exacerbadamente necessária para a neutralização de  $H_2O_2$ , cujo conteúdo pode estar aumentado no contexto oxidativo local observado devido aos elevados níveis de peroxidação lipídica e como produto da neutralização de  $O_2^{\cdot-}$ . O próprio  $H_2O_2$  pode agir como agente peroxidativo, afetando a atividade de sua enzima sequestrante. Além disso, atividade de CAT diminuída colabora para o aumento nos níveis de  $H_2O_2$  que, por sua vez, pode contribuir para a peroxidação lipídica tecidual (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Com relação aos achados histológicos, estes corroboram os resultados observados nas investigações realizadas, especialmente relativos ao aumentado conteúdo de triglicerídeos hepáticos. Relato da literatura mostrou que ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura e sacarose apresentaram infiltração gordurosa nos hepatócitos caracterizada por volumosos vacúolos lipídicos que provocaram distensão celular e deslocamento do núcleo e citoplasma (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2009). Em outro estudo, camundongos C57BL/6J, alimentados por dieta *chow* durante dezoito semanas apresentaram arquitetura hepática normal, semelhante aos achados do presente trabalho (BIDDINGER *et al.*, 2004). Por outro lado, os animais alimentados com dieta *high fat* mostraram profunda esteatose com acúmulo macrovesicular de gordura. Contrariamente, os achados histológicos observados no presente estudo mostraram infiltração celular nos hepatócitos dos animais HC caracterizados, principalmente, por pequenos e numerosos vacúolos, mas sem evidências de deslocamento do núcleo. DeLeve e Colaboradores (2008) utilizando um modelo de síndrome metabólica com obesidade em camundongos C57BL/6J, através de dieta HF, aplicada durante sete meses, observaram o desenvolvimento de esteatohepatite e fibrose, característicos de doença hepática gordurosa avançada. A avaliação permitiu concluir ainda que quanto maior o tempo de

exposição dietética, maior o grau de alterações metabólicas e histológicas. As observações obtidas no presente trabalho mostraram, nos animais HC, inúmeros focos inflamatórios e fibróticos, característicos de doença hepática avançada, o que não foi observado nos animais do grupo CT. Segundo Pereira e Colaboradores (2007), o comprometimento sistêmico induzido pela RI pode culminar com um desequilíbrio na fisiologia normal do sistema renina-angiotensina (SRA), contribuindo para a instalação e progressão do processo fibrótico tecidual. Há evidências de que o SRA pode estar envolvido no processo de fibrose hepática através da ativação dos receptores tipo 1 pela angiotensina II (Ang II). Esta sinalização induz contração e proliferação de células estreladas hepáticas (HSCs; *hepatic stellate cells*) e aumenta a expressão de colágeno I. A fibrogênese hepática é mediada pelas HSCs e os produtos da peroxidação lipídica originados de estresse oxidativo são importantes ativadores destas células e, portanto participam no processo fibrótico (DeLEVE *et al.*, 2008).

A figura 14 ilustra uma possível associação entre alguns dos resultados encontrados no presente trabalho.



**Figura 14.** Mecanismo fisiopatológico possivelmente envolvido nos resultados encontrados nos animais HC. (1) A exposição prolongada a dieta hiperlipídica culminou com a instalação de um estado de resistência à insulina (RI) que por sua vez é cauda da instalação e progressão das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) observadas (2) além de contribuir para o aumento nos níveis locais do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (4) e de alterações nas partículas de VLDL iniciadoras das demais alterações no perfil lipídico local com elevação nos níveis de triglicérides (TG), colesterol e suas frações IDL, LDL e HDL (3). Por sua vez, a progressão das DHGNA está associada ao aumento nos níveis de peroxidação lipídica local (5) que contribuem para a elevação nas espécies reativas, principalmente o radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (6). Este então reage com O<sub>2</sub><sup>•-</sup> induzindo o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o que possivelmente é o maior determinante da diminuição da atividade local de catalase (7).



**CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- Os principais marcadores de função hepática, ALT, AST, ALP e  $\gamma$ -GT, mostraram-se significativamente elevados no grupo HC, indicando grave comprometimento funcional do órgão nestes animais;
- A investigação sobre o conteúdo hepático de lipídeos teciduais mostrou que, apesar do conteúdo lipídico total apresentar valores semelhantes entre os grupos, os níveis de triglicerídeos, colesterol total e as frações de lipoproteínas, com exceção de LDL, encontram-se alteradas;
- A avaliação do estado redox, através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, mostrou significativos níveis de peroxidação lipídica hepática, indicando comprometimento do balanço redox local;
- A atividade da enzima superóxido dismutase não apresentou diferença, já a da catalase mostrou-se significativamente diminuída no grupo HC, sugerindo um forte comprometimento no balanço redox hepático para esta enzima nos animais submetidos a intervenção dietética hipercalórica;
- Os achados histológicos do tecido hepático dos animais do grupo HC apresentaram comprometimento do arranjo morfológico celular, infiltração vacuolar no interior dos hepatócitos, infiltração inflamatória e presença de focos de fibrose tecidual, corroborando os principais parâmetros bioquímico-enzimáticos obtidos, sendo compatíveis com padrão cirrótico, ou seja, doença em estado avançado.
- Em suma, o componente hepático do modelo murino dietético para síndrome metabólica estudado apresenta alterações em seu perfil morfológico, funcional e no balanço redox.



## **7 PERSPECTIVAS**

O modelo murino utilizado no presente trabalho apresenta-se com síndrome metabólica induzida por dieta sem o desenvolvimento de obesidade, diferentemente daqueles rotineiramente descritos na literatura. Trata-se, pois, de uma possibilidade de se estudar os eventos fisiopatológicos envolvidos no agravo em humanos, diagnosticados sem a presença de obesidade, mas com acúmulo adiposo visceral. Isoladamente, este modelo pode representar um avanço nesta vertente de estudos, visto que o maior volume de descrições atuais está voltado para a associação com a obesidade corporal. Frente a isso, o nosso grupo estuda a viabilidade para proteção intelectual da tecnologia obtida. O aprimoramento dos estudos, tanto em outros roedores quanto com a dieta experimental, estão em andamento, sendo objeto de tese de doutorado e dissertações de mestrado do nosso grupo (Laboratório de Reatividade Cardiovascular; FSO/ICBS; Universidade Federal de Alagoas) em colaboração com o Prof Dr Fabiano Elias Xavier e Profa Dra Glória Duarte (Laboratório de Reatividade Vascular; Universidade Federal de Pernambuco). Desta forma, pretende-se continuar contribuindo para os estudos científicos acerca do tema aqui dissertado.

**REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Current Opinion Lipidology*. 2006; 17:238-246.

Adiels M, Olofsson S, Taskinen M, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology*. 2008; 28:1225-1236.

AGA Technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002; 123:1705-1725.

Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis. An analytic review. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2002; 35(3):253-261.

Allard JP, Aghdassi E, Mohammed S, Raman M, Avand G, Arendt BM, Jalali P, Kandasamy T, Prayitno N, Sheman M, Guindi M, Ma DWL, Heathcote JE. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *Journal of Hepatology*. 2008; 48: 300-307.

Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal Experimental Pathology* 2006; 87:1-16.

Arraya AV, Valera JM, Contreras J, Csendes A, Díaz JC, Burdiles P, Rojas J, Maluenda F, Smok G, Poniachik J. Alteraciones de la tolerância a la glucosa y frecuencia de síndrome metabólico em pacientes con enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista Médica de Chile*. 2006; 134:1092-1098.

Arner P. Not all fat is alike. *Lancet*. 1998; 351:1301-1302.

Athyros VG, Mikhailidis DP, Didangelos TP, Giouleme OI, Liberopoulos EM, Karagiannis A, Kakafika AI, Tziomalos K, Burroughs AK, Elisaf MS. Effect of multifactorial treatment on non-alcoholic fatty liver disease in metabolic syndrome: a randomised study. *Current*

*Medical Research Opinion*. 2006; 22(5):873-883.

ATP III. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults Treatment Panel III). Final report. *Circulation*. 2002; 106:3143-3421.

Ávila ALV-E. Tratamento não farmacológico da síndrome metabólica: abordagem do nutricionista. *Revista da Sociedade de cardiologia do Estado de São Paulo*. 2004; 14(4):652-658.

Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G, Tiengo A. Metabolic aspects of essential obesity. *Epatologia*. 1965; 11:226-238.

Barness LA, Opitz JM, Gilbert-Barness E. Obesity: genetic, molecular and environmental aspects. *American Journal of Medical. Genetics Part A*. 2007; 143:3016-3034.

Bedogni G, Miglioli L, Mautti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. 2005; 42:44-52.

Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD, Kabir M, Richey JM, Ader M. Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *The American Journal of Medicine*. 2007; 120(2A):S3-S8.

Bertolimi, MC. Alterações do metabolismo lipídico no paciente com síndrome metabólica. *Revista da Sociedade de cardiologia do Estado de São Paulo*. 2004; 4:551-6.

Bhathena SJ, Ali AA, Haudenschield C, Latham P, Ranich T, Mohamed AI, Hansen CT; Velasquez MT. Dietary flaxseed meal is more protective than soy protein concentrate against hypertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. *Journal of the American College of Nutrition*. 2003; 22 (2):157-164.

Biddinger SB, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, Kahn CR. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA

desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2005; 54:1314-1323.

Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology* 2004; 24:644-649.

Bradford MM. An rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-254.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal Clinical Investigation*. 2004; 114:147-152.

Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology Metabolism Clinics North America*. 2004; 33:351-375.

Chen W, Berenson GS. Metabolic syndrome: definition and prevalence in children. *Jornal de Pediatria*. 2007; 83(1):1-3.

Choi S-W, Benzie IFF, Ma S-W, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 44:1217-1231.

Chou Y-C, Wang S-Y, Chen G-C, Lin Y-S, Chao P-M. The functional assessment of *Alpinia pricei* on metabolic syndrome induced by sucrose-containing drinking water in mice. *Phytotherapy Research*. 2008

Condezo-Hoyos L, Abderrahim F, Conde MV, Susín C, Díaz-Gil JJ, Gonz'lez MC, Arribas SM. Anioxidantactivity of liver grown factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46:656-662.

Cong W, Tao R, Tian J, Liu G, Ye F. The establishment of a novel non-alcoholic steatohepatitis model accompanied with obesity and resistance in mice. *Life Sciences*. 2008; 82:983-990.



Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. Guanabara Koogan. 2000; 27-43.

Danforth EJr. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nature Genetics*. 2000; 26:13.

Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2002; 16(5):663-678.

DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Atkinson RD, McCuskey RS. Prevention of hepatic fibrosis in a murine model of metabolic syndrome with nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Pathology*. 2008; 173:993-1001.

Diaz-Gil JJ, Sánchez G, Trilla C, Escartin P. Identification of biliprotein as a liver growth factor. *Hepatology*. 1988; 8:484-486.

I Diretriz Brasileira de diagnostic e tratamento da syndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005; 84(1):1-27.

Eckel R, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365:1415-1428.

Fan J-G, Zhu J, Li X-J, Chen L, Lu Y-S, Li L, Daí F, Li F, Chen S-Y. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005; 20:1825:1832.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006; 43:S99-S112.

Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effects of polyphenols: involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46:624-632.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43(1):61-68.

Ferreira AP, Oliveira CE, França NM. Metabolic syndrome and risk factors for cardiovascular disease in obese children: the relationship with insulin resistance (HOMA-IR). *Jornal de Pediatria* . 2007; 83:21-26.

Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obesity Reviews*. 2004; 5:27-42.

Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Parkington HC, Head GA, Evans RG. Endothelial dysfunction and arterial pressure regulation during early diabetes in mice: roles for nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007; 293:R707-R713.

Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1956; 226:497-509.

Fonseca FAH. Síndrome metabólica sem obesidade central: mito ou realidade? *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2008; 15(3):168-169.

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002; 287:356-359.

Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972; 18:499-502.

Furukawa S, Fugita T, Shimabukuru M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal Clinical Investigation* 2004; 114:1752-1761.

Gadja A, Pellizzon MA, Ricci MR, Ulman EA. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. *Animal Lab News*. 2007.

Ginsberg HN. Efficacy and mechanisms of action of statins in the treatment of diabetic dyslipidemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91:383-392.

Grundey SM, Brewer B, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004; 109:433-438.

Hanley AJG, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino Jr RB, Haffner SM. Liver markers and development of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2005; 54:3140-3147.

Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual Review of Nutrition*. 2000; 20:365-393.

Hsiao PJ, Kuo KK, Shin SJ, Yan YH, Lin WY, Yang JF, Chiu CC, Chuang WL, Tsai TR, Yu ML. Significant correlations between severe fatty liver and risk factors for metabolic syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007; 22:2118-2123.

IDF. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology task force consensus group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366:1059-1062.

Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabetic Medicine*. 2005; 22:1141-1145.

Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2005; 54:117-121.

Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 2007; 27:27-38.

Lam TK, van de WG, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2003; 284:E281-E290.

Leclercq IA, Morais AS, Schroyen B, Hul NV, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *Journal of Hepatology*. 2007; 47:142-156.

Lee K-I, Kim JM, Park JY, Kim JW, Mok JY, Park M-K, Lee H-J, Hong SH, Li W, Kim DK. The effect of fenofibrate and exercise on metabolic syndrome and hepatic steatosis in OLETF rats. *Journal of Korean Society of Endocrinology*. 2007; 22:192-202.

Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J mice. *International Journal of Obesity*. 2000; 24:639-646.

Lopes HF. Aspectos históricos da síndrome metabólica. In: Lopes HF. Síndrome metabólica: uma abordagem multidisciplinar. Atheneu. 2007; 1-4.

Maio R, Dichi JB, Burini RC. Consequências nutricionais das alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2000; 37(1): 52-57.

Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2008; 44:1259-1272.

Marceau P, Biron S, Hould F-S, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84(5):1513-1517.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2001; 50:1844-1850.

Marchesini G, Natale S, Manini R, Agostini F. Review article: the treatment of fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005; 22(2):37-39.

McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006; 40:S17-S29.

McGirt MJ, Parra A, Sheng H, Higuchi Y, Oury TD, Laskowitz DT, Pearlstein RD, Warner DS. Attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Stroke*. 2002; 33:2317-2323.

Medina J, Fernandez-Salazar LI, García-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2057-2066.

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Cheresnev I, Dansky HM. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circulation Research*. 2005; 96:1178-1184.

Musso G, Gambino R, de Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Faga E, Silli B, Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2003; 37:909-916.

Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153:6-20.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006; 295:1549-1555.

Oliveira RC. A transição nutricional no contexto da transição demográfica e epidemiológica. *Revista Mineira de Saúde Pública*. 2004; 3(5):16-23.

OMS. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*. 1998; 15:539-553.

Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology*. 2002; 35:367-372.

Pajuelo J, Bernui I, Nolberto V, Peña A, Zevillanos L. Síndrome metabólico en adolescentes con sobrepeso y obesidad. *Anales de la Facultad de Medicina de Lima*. 2007; 68(2):143-149.

Papandreou D, Rousso I, Mavromichalis I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. *Clinical Nutrition*. 2007; 26:409-415.

Pereira RM, Santos RAS, Teixeira MM, Leite VHR, Costa LP, Dias FLC, Barcelos LS, Collares GB, Silva ACS. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of angiotensin-(1-7). *Journal of Hepatology*. 2007; 46:674-681.

Poniachik J, Mancilla C, Cotreras J, Csendes A, Smok G, Cavada G, Rojas J, Oksenberg D, Burdiles P, Maluenda F, Díaz JC. Obesity: risk factor for steatohepatitis and hepatic fibrosis. *Revista Medica de Chile*. 2002; 130:731-736.

Prata PR. A transição epidemiológica no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 1992; 8(2):

Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(26):3540-3553.

Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgereit J, Bader M, Santos RAS, Alenina N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2008; 2:418-424.

Rabelo LA. Disfunção endotelial na aterosclerose: papel do peróxido de hidrogênio e tratamento preventivo com o flavonóide diocleína. [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte. UFMG. 2004.

Rantala AO, Lilja M, Kauma H, Savolainen MJ, Reunanen A, Kesäniemi YA. Gamma-glutamyl transpeptidase and the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine*. 2000; 248:230-238.

Reaven GM. Banting lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595-1607.

Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline deficient (MCD) diet. *Journal of lipid research*. 2008; 49:1068-1076.

Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*. 2008; 582:1783-1787.

Romero MJ, Pltt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circulation Researcher*. 2008; 102:95-102.

Rover Jr L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*. 2001; 24(1):112-119.

Ryan MC, Wilson AM, Slavin J, Best JD, Jenkins AJ, Desmond PV. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care*. 2005; 28:1222-1224.

Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(31):32345-32353.

Schreyer SA, Deborah L, Wilson DL, Leboeuf RC. C57BL:6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1998; 136:17-24.

Shen X, Bornfeldt KE. Mouse models for studies of cardiovascular complications of type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1103:202-217.

Shirouchi B, Nagao K, Inoue N, Furuya K, Koga S, Matsumoto H, Yanagita T. Dietary phosphatidylinositol prevents the development of nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (*fa/fa*) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56(7):2375-2379.

Sims EA. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism*. 2001; 50:1499-1504.

Song Q, Wang SS, Zafari AM. Genetics of the metabolic syndrome. *Hospital Physician*. 2006; 51-61.

Sorbi D, McGill DB, Thistle JL, Therneau TM, Henry J, Lindor KD. An assessment of the role of liver biopsies in asymptomatic patients with chronic liver test abnormalities. *American Journal of Gastroenterology*. 2000; 95:3206-3210.

Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *Journal Clinical Investigation*. 2005; 115:1139-1142.

Targher G. Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens. *Diabetic Medicine*. 2007; 24:1-6.

Toye AA, Dumas ME, Blancher C, Rothwell AR, Fearnside JF, Wilder SP, Bihoreau MT, Cloarec O, Azzouzi I, Young S, Barton RH, Holmes E, McCarthy MI, Tatoud R, Nicholson JK, Scott J, Gauguier D. Subtle metabolic and liver gene transcriptional changes underlie diet-induced fatty liver susceptibility in insulin-resistant mice. *Diabetologia*. 2007; 50:1867-1879.

Ueki K, Kondo T, Tseng Y-H, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse.



*PNAS*. 2004; 101(28):10422-10427.

Urquiaga I, Guasch V, Marshall G, San Martín A, Castilo Ó, Rozowski J, Leighton F. Effect of Mediterranean and occidental diets, and red wine, on plasma fatty acids in humans. An intervention study. *Biological Research*. 2004; 37:253-261.

Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurements of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*. 1993; 208:10-15.

Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care*. 2005; 28:2913-2918.

Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurements of thiobarbituric acid reacting substances formation in single micrititer plate: its use of evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry* 1993; 208: 10-15.

Wasmuth HE, Zaldivar MM, Beraza N, Trautwein C. Of mice and NASH – from fat to inflammation and fibrosis. *Drug discovery today: disease models/ metabolic disorders*. 2007; 4(1): 25-30.

Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(3):S215-S219.

Yanagita T, Nagao K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 17(S1):189-191.

Yoshida H, Inagaki T, Hiranot M, Sugimoto T. Analyses of azopigments obtained from the delta fraction of bilirubin from mammalian plasma (mammalian bilirubin). *Biochemical Journal*. 1987; 248:79-84.

Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Archiv*. 2004; 444:3-12.

**APÊNDICE**

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

## 9 APÊNDICE

### **Síndrome metabólica sem obesidade em modelo murino dietético: balanço redox, funções e morfologia hepática**

Diet-induced metabolic syndrome in mice without obesity: state redox, function and hepatic morphological

Glaucevane da Silva Guedes<sup>1</sup>, Valéria Nunes Souza<sup>1</sup>, Lucas José Sá da Fonseca<sup>1</sup>, Salette Smaniotto<sup>2</sup>, Luíza Antas Rabêlo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL); <sup>2</sup>Laboratório de Imunohistologia, ICBS, UFAL.

#### **RESUMO**

**Objetivo:** Avaliar o perfil morfológico, funcional e o balanço redox hepático em um modelo murino dietético para síndrome metabólica sem obesidade. **Métodos:** Onze camundongos isogênicos machos C57BL/6J foram randomicamente divididos nos grupos Controle (CT) e Hipercalórico (HC) e alimentados com dieta *chow* e hipercalórica, respectivamente, durante 26 semanas. Foram procedidas avaliações plasmáticas de marcadores de função hepática e avaliações histológica e do estado redox no tecido hepático. **Resultados:** Foram encontradas alterações nos principais marcadores de função hepática (ALT, AST e ALP), comprometimento no balanço redox (peroxidação lipídica e diminuída atividade de catalase) e achados histológicos correspondentes à doença hepática avançada nos animais HC. **Conclusão:** O componente hepático no modelo murino dietético para síndrome metabólica estudado apresenta alterações em seu perfil morfológico, funcional e no balanço redox.

**Palavras-chave:** funções hepáticas, balanço redox, modelo murino dietético, síndrome metabólica.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the morphological profile, liver function and redox balance in a diet-induced mice model for metabolic syndrome without obesity. **Methods:** Eleven isogenic male C57BL/6J mice were randomly divided into control (CT) and hypercaloric (HC) groups and fed *chow* and *high fat* diet, respectively, for 26 weeks. We evaluated serum markers of liver function, histological evaluations and redox status in liver tissue. **Results:** There were changes in main markers of liver function (ALT, AST and ALP), involvement in redox balance (lipid peroxidation and decreased activity of catalase) and histological findings corresponding to the advanced liver disease in animals HC. **Conclusion:** The hepatic component in diet-induced mice model for metabolic syndrome presents changes to its profiles morphological, functional and redox balance.

**Keywords:** liver functions, redox balance, mice, metabolic syndrome.

## INTRODUÇÃO

As taxas de morbidade e mortalidade, associadas aos componentes da síndrome metabólica (SM), têm-se elevado dentre os indivíduos de diferentes etnias decorrente, principalmente, das alterações no estilo de vida, com destaque para o componente dietético. Apesar de grande parte dos óbitos terem associação direta com os componentes vasculares da SM, as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) têm ganhado destaque na literatura atual como

o componente hepático da mesma. Contudo, semelhantes aos demais parâmetros que caracterizam o perfil sindrômico, muitas vezes apresentam-se de forma assintomática, o que pode acentuar o grau de comprometimento do órgão e, assim, do indivíduo<sup>1-3</sup>.

Neste contexto, é crescente a busca por métodos diagnósticos precoces e por uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos patológicos envolvidos no agravo, de maneira à melhor direcionar as ações preventivas e medidas terapêuticas<sup>1,4-6</sup>. Assim, os modelos murinos têm destaque devido, principalmente, à semelhança genética com o homem e à facilidade de manejo como tamanho, necessidade de menor espaço, rápida reprodução<sup>7-10</sup>, sendo o protótipo proposto neste trabalho para avaliar o componente hepático em modelo dietético para síndrome metabólica sem o fenótipo de obesidade corporal.

## **MÉTODOS**

### **Grupo amostral**

Onze camundongos C5BL/6J isogênicos machos foram randomicamente divididos nos grupos experimentais Controle (CT), alimentado com dieta *chow*, e Hipercalórico (HC), alimentado com dieta hipercalórica, sendo compostos por, pelo menos, cinco animais cada. Os grupos foram mantidos em condições experimentais padrão, com livre acesso a água, ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C. O estudo foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema 2 x 1, originando dois tratamentos (dietas *chow* e hipercalórica) e, pelo menos, cinco repetições, por um período de vinte e seis semanas. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Belo Horizonte (Uni-BH).

### **Análises bioquímicas**

Avaliou-se as concentrações plasmáticas de albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), através de *kits* colorimétricos comerciais Labtest<sup>®</sup>, conforme as instruções do fabricante, para avaliação das funções hepáticas no modelo. Já a concentração de proteínas totais (PTNs) foi medida através do método colorimétrico de Bradford<sup>11</sup> com leitura espectrofotométrica a 595 nm.

### **Perfil lipídico tecidual**

Para análise de lipídeos totais no tecido hepático foi utilizado o método de Folch e Colaboradores<sup>12</sup>. Os valores obtidos foram normalizados pelo peso do tecido utilizado na análise. Para a dosagem dos diferentes componentes lipídicos, os extratos obtidos foram ressuspensos e homogeneizados em 500 µL de isopropanol. A partir da suspensão, os teores de triglicerídeos (TG), colesterol total (COL) e HDL foram mensurados pela utilização de *kits* comerciais Labteste<sup>®</sup>. Utilizando as equações de Friedewald<sup>13</sup>, calculou-se as concentrações de VLDL ( $VLDL = TG/5$ ) e de LDL ( $LDL = COL - (HDL + VLDL)$ ).

### **Estado redox hepático**

O homogenato tecidual obtido por pulverização em nitrogênio líquido foi acrescido de concentrações conhecidas de PBS, inibidores de proteases (PMSF, apotina e leupetina) e EDTA. Em seguida, as amostras foram submetidas a duas centrifugações sequenciadas por 30 minutos a 4.000 rpm a 4 °C.

O grau de peroxidação lipídica foi medida em microplaca pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método descrito por Wallin e Colaboradores<sup>14</sup> com adaptações realizadas por Rabêlo<sup>15</sup>. Resumidamente, a 100 µL do homogenato hepático foram adicionados 10 µL do antioxidante BHT ( $[BHT]_{final} = 5mM$ ) e

1250  $\mu\text{L}$  de uma solução do ácido tiobarbitúrico a 1,3 %. Uma curva padrão foi preparada com 190  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de 1,1,3,3-tetra-metoxi-propano (0-7,5 nmol/L) e 10  $\mu\text{L}$  de BHT. Em seguida, o produto da reação foi incubado a 95 °C por 60 minutos, seguida de banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor para microplacas, tendo-se como comprimento 530 nm.

#### **Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da enzima SOD foi determinada no homogenato hepático em microplaca através da utilização de *kit* comercial Fluka<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante, utilizando-se o comprimento de leitura de 450 nm. Os dados foram normalizados pelo conteúdo tecidual protéico<sup>11</sup>.

#### **Atividade da catalase (CAT)**

A mensuração da atividade de CAT foi realizada em microplaca. Sucintamente, 100  $\mu\text{L}$  do homogenato hepático foi adicionado à placa, seguido do acréscimo de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}} = 1\text{mM}$ ). Em seguida, adicionou-se uma substância cromógena e o produto reacional foi quantificado em microplaca a 550 nm em uma leitora para microplacas. Uma curva padrão foi preparada para calcular a concentração da enzima nas amostras de homogenato de tecido hepático. Os reagentes foram preparados imediatamente antes do início da reação. A concentração de CAT foi normalizada pela concentração tecidual de PTNs medida através do método colorimétrico de Bradford<sup>11</sup>. Salienta-se que a metodologia utilizada encontra-se em fase final de escrita do documento envolvendo a proteção técnico-científica. Assim, os detalhes relacionados à metodologia não estão aqui expostos.

### **Análise histológica**

Os fragmentos hepáticos foram fixados por imersão em formalina a 10 % por, no máximo, 16 horas. Em seguida, o material biológico foi submetido a processamento em crescentes concentrações de álcool e xilol e então incluídos em parafina. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual, tendo-se 4 µm como padrão para a espessura de corte. As lâminas foram montadas, em um total de quatro por animal experimental, com, no mínimo, dois fragmentos por lâmina. As mesmas foram devidamente coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise morfológica hepática e suas possíveis alterações foi realizada em microscópio óptico de luz. O registro fotográfico dos resultados foi obtido utilizando-se uma câmara fotográfica digital (7.2 megapixels, Sony<sup>®</sup>), tendo sido expressos resultados representativos por grupo experimental.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de comparação entre curvas do tipo *Bonferroni*. Os demais resultados foram analisados através de teste T de *Student* não pareado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estaticamente significativos. Os valores de “n” significam o número de animais que foram utilizados nos experimentos. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel<sup>®</sup> (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph Pad Prism<sup>®</sup> 4.0 (San Diego, CA, USA), respectivamente.

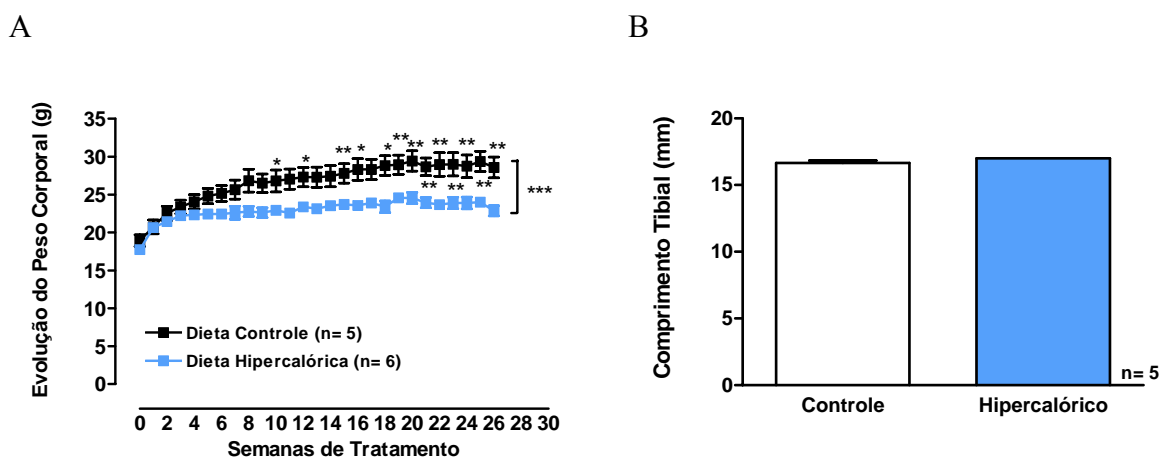
## **RESULTADOS**

### **Crescimento dos animais**

Observou-se diferença significativa entre as médias de peso dos animais dos grupos a partir



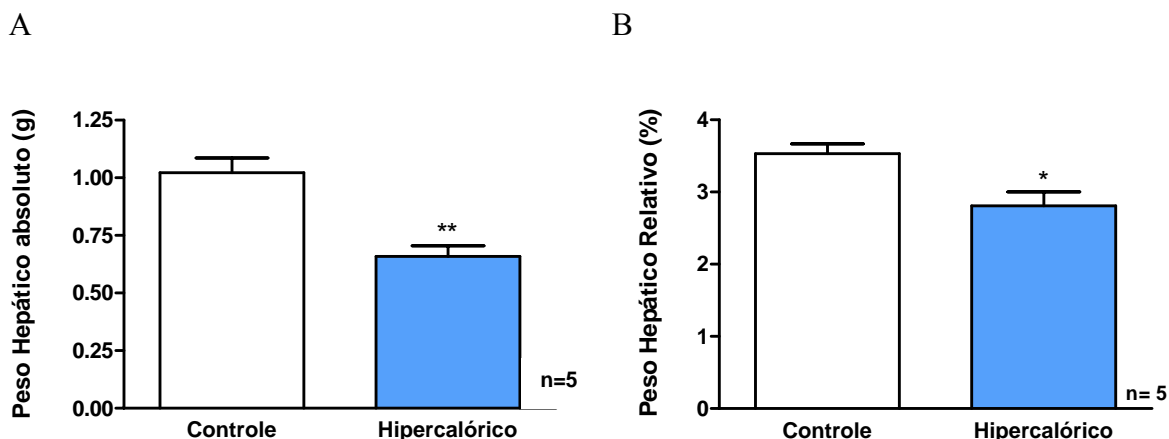
da décima primeira semana de exposição à dieta ( $p < 0,05$ ). Nas demais semanas de tratamento, essa diferença foi ainda maior. Nota-se que o peso dos animais do grupo CT manteve um aumento maior que aquele do grupo HC durante todo o período (Figura 1A). Contudo, a avaliação do crescimento animal pela medida do comprimento tibial mostrou que não houve diferença de crescimento entre os grupos (Figura 1B).



**Figura 1.** (A) Peso corporal dos Camundongos C57BL/6J durante 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em gramas (g) de peso corporal de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. ANOVA (duas vias) e teste de *Bonferroni*: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (B) Crescimento dos Camundongos C57BL/6J, através do comprimento tibial (mm), após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em milímetros (mm) e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM. Teste *t de Student* não pareado.

### Avaliação hepática

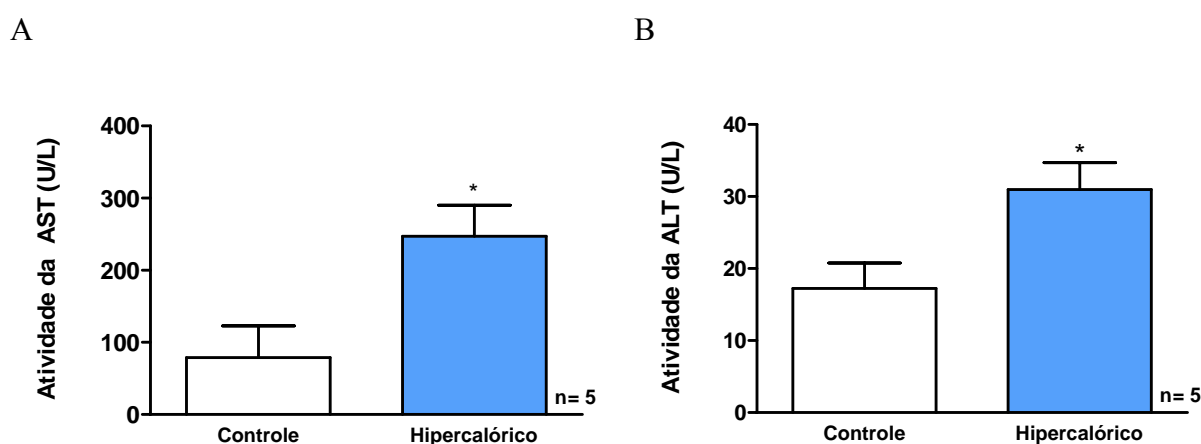
A avaliação do peso absoluto e relativo do fígado mostrou diminuição estatisticamente significativa no órgão dos animais HC (Figura 2A e B), indicando que este grupo apresentou menor desenvolvimento hepático, o que por si só já pode representar prejuízo funcional. Além disso, o resultado é compatível com o padrão histológico observado.



**Figura 2.** (A) Peso hepático absoluto e (B) relativo, através da comparação ao peso corporal, dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em gramas (g) e percentual (%), respectivamente, e representam, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ .

### Marcadores de função hepática

Os resultados obtidos na avaliação dos principais marcadores de função hepática, ALT, AST e ALP (Figura 3A, B e Tabela 1) apontam lesão hepática nos animais do grupo HC. As diferenças encontradas entre os grupos CT e HC foram estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). As concentrações plasmáticas de albumina e PTNs não apresentaram diferença nas análises realizadas (Tabela 1).



**Figura 3.** Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (B), marcadoras de função hepática, no plasma dos Camundongos C57BL/6J, em U/L, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em unidade enzimática por litro de analito (U/L), isto é, quantidade de enzima necessária para produzir 1 mol de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ .

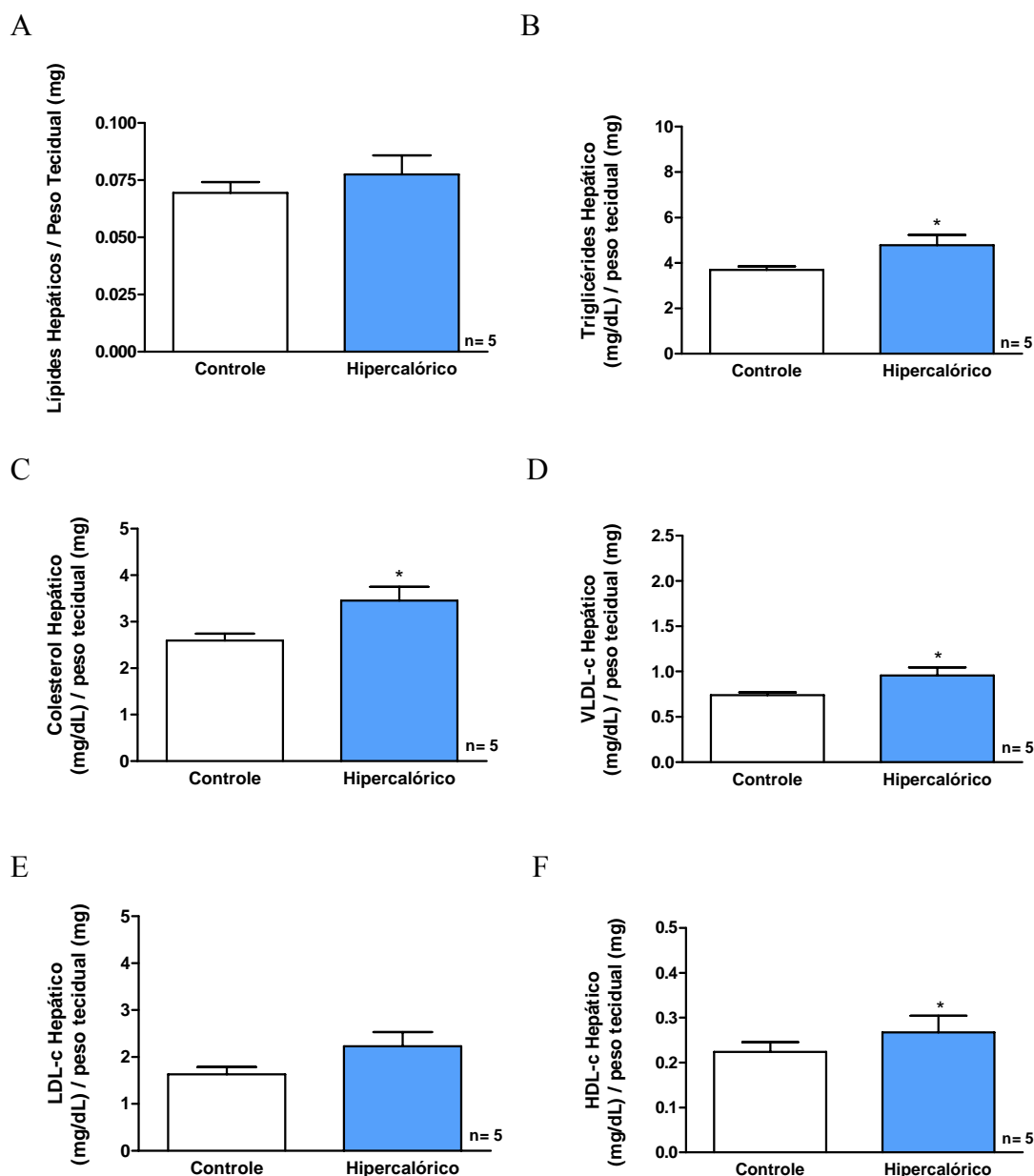
**Tabela 1.** Atividade plasmática de fosfatase alcalina (ALP) e concentrações plasmáticas de albumina e proteínas totais dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de intervenção dietética Controle e Hipercalórica.

<b>Parâmetro</b>	<b>Grupo CT</b>	<b>Grupo HC</b>	<b>Resultado estatístico</b>
ALP (U/L)	1,66 ± 2,43	12,30 ± 2,16	p<0,01
Albumina (mg/mL)	10,47 ± 2,52	10,08 ± 0,96	NS
PTNs (mg/mL)	74,06 ± 5,99	88,66 ± 2,50	NS

ALP (fosfatase alcalina) U/L: unidade enzimática por litro de analito, quantidade de enzima necessária para produzir um mol de p-nitrofenol. Os valores estão expressos como média ± EPM obtidos de, pelo menos, cinco animais por grupo experimental. Teste *t de Student* não pareado: \*p<0,05, \*\* p<0,01.

### **Conteúdo lipídico hepático**

Com relação ao teor lipídico total, os resultados observados não apresentaram diferença entre os dois grupos experimentais (Figura 4A). Os resultados dos parâmetros TG, COL, VLDL e HDL apresentaram-se estatisticamente diferentes (p<0,05), sendo maiores nos animais HC (Figura 4B, C, D e F). No parâmetro LDL, não foi observada diferença entre os grupos experimentais (Figura 4E).

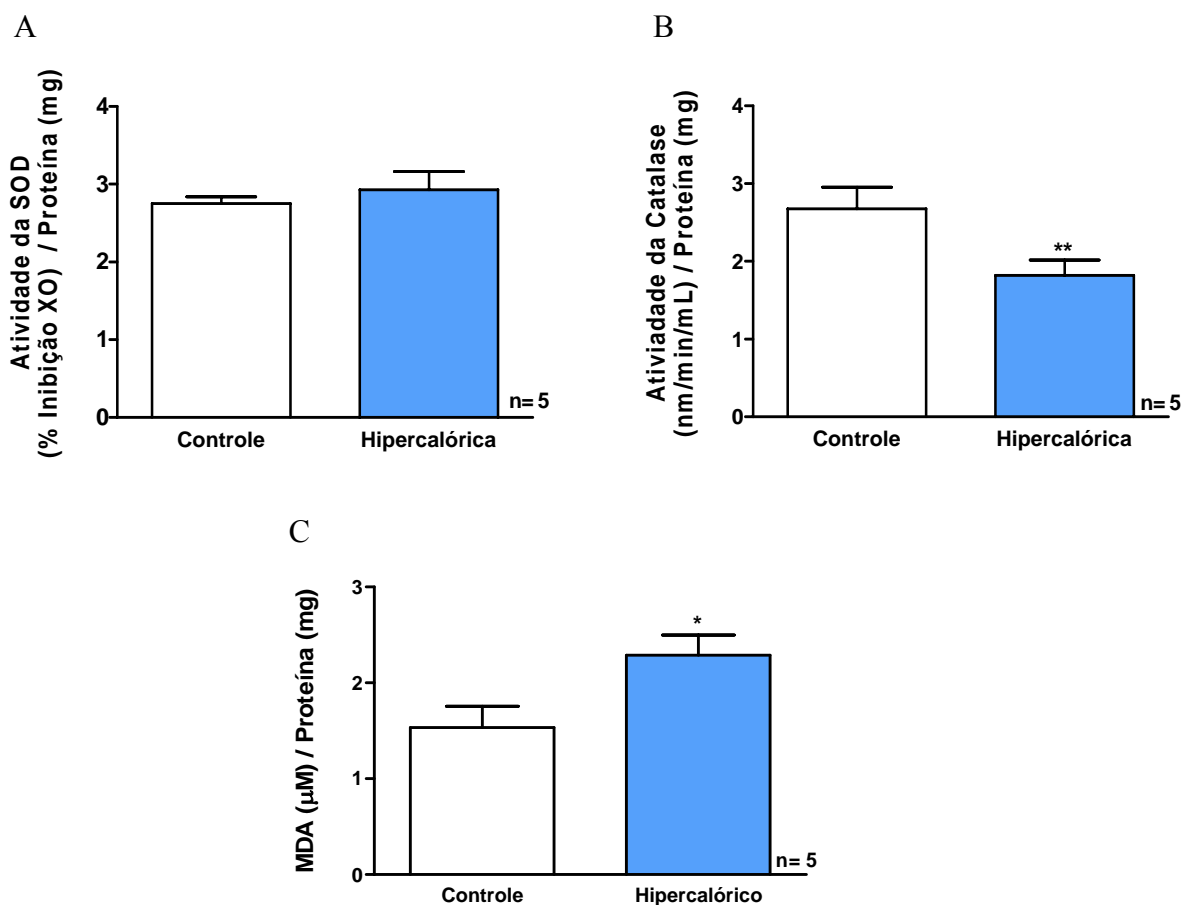


**Figura 4.** (A) Conteúdo lipídico total no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg por mg de peso tecidual. (B, C, D, E e F) Concentrações observadas no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, em mg/dL, de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL, respectivamente, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. Os valores estão expressos em miligramas por miligramas de tecido e representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ .

### Estado redox hepático

Como pode ser observado, a atividade da SOD não apresentou diferença entre os dois grupos experimentais (Figura 5A). Por outro lado, a atividade da catalase mostrou-se significativamente diminuída ( $p < 0,01$ ) no grupo HC (Figura 5B), apontando para um desequilíbrio no balanço redox local. Os níveis de peroxidação lipídica tecidual apresentaram-

se significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) no grupo HC (Figura 5C), o que corrobora o resultado observado na atividade da catalase para desbalanço no estado redox local.

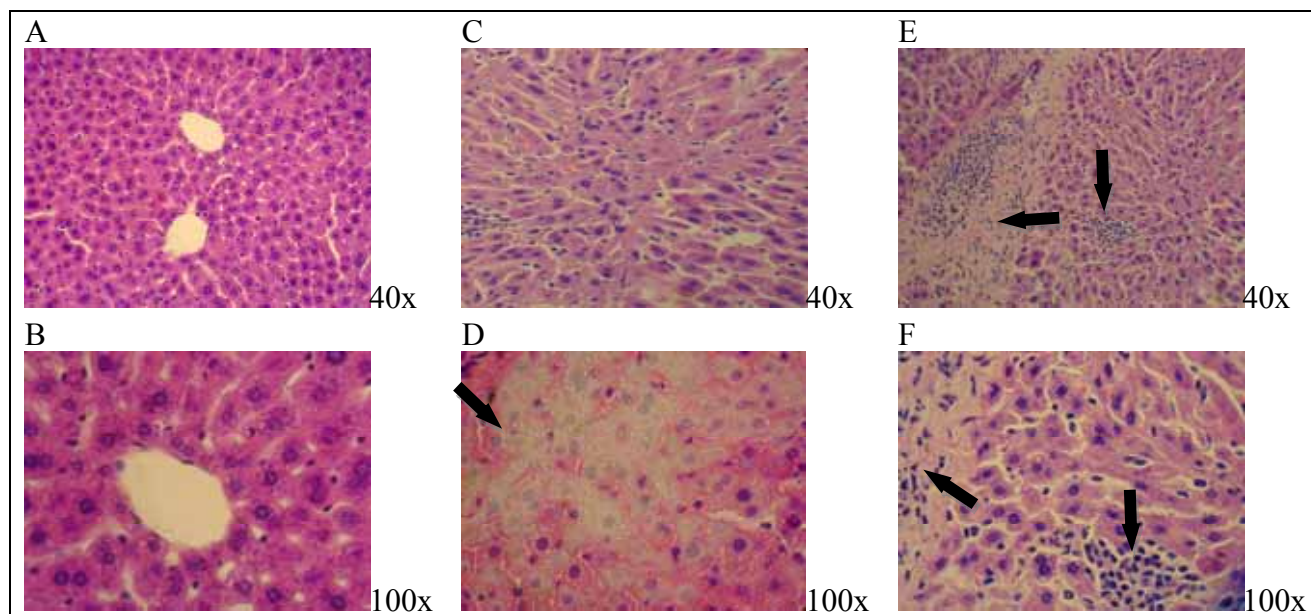


**Figura 5.** Estado redox no tecido hepático dos Camundongos C57BL/6J, após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. A) Atividade da SOD (superóxido dismutase) em percentual de inibição da enzima XO (xantina oxidase) por miligrama de proteína. B) Atividade da catalase em nm/min/mL normalizada pela concentração hepática de proteínas em miligrama. C) Peroxidação lipídica em concentração de MDA (malonaldeído) por miligrama de proteína. Os valores apresentados representam cinco animais por grupo experimental. Cada barra do gráfico representa a média  $\pm$  EPM de cinco animais. Teste *t de Student* não pareado: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### Avaliação histológica do fígado

Percebe-se o arranjo celular normal nos cortes provenientes dos animais do grupo CT (Figuras 6A e B) com os cordões de hepatócitos, os espaços sinusoidais e portais e veia centrolobular. Já na análise dos animais do grupo HC foi evidenciado um desarranjo na estrutura do lóbulo hepático, com células espaçadas infiltradas com pequenos vacúolos transparentes indicativos de infiltração gordurosa, vários pontos de aglomerado de células inflamatórias, focos de

tecido fibrótico e regiões de características amorfas, característicos de padrão cirrótico (Figuras 6C-F). Os resultados expressos são representativos dos dois grupos experimentais, compostos por cinco animais cada.



**Figura 6.** Microfotografias de cortes histológicos obtidos dos Camundongos C57BL/6J e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), após 26 semanas de aplicação de protocolo de dietas Controle e Hipercalórica. As microfotografias apresentadas representam os principais achados histológicos por grupo experimental. (A) Histologia hepática normal do grupo Controle, aumento de 40x. (B) Histologia hepática normal do grupo Controle, aumento de 100x. (C) Desarranjo da organização celular hepática, com vacuolização intracelular intensa e focos de inflamação no grupo Hipercalórico, aumento de 40x. (D) Vacuolização celular grupo HC, aumento de 100x. (E) Extenso foco de inflamação e fibrose grupo HC, aumento de 40x. (F) Foco de inflamação e fibrose grupo HC, aumento de 100x.

## DISCUSSÃO

Pode-se sugerir que a diferença ponderal observada entre os grupos (Figura 1) não envolve o comprometimento no desenvolvimento animal do grupo HC, mas uma elevação ponderal menor por este grupo durante o período. DeLeve e Colaboradores<sup>16</sup> trataram camundongos C57BL/6J por 26 semanas com dieta *high fat* (HF) ocidentalizada, para o desenvolvimento de obesidade. Se compararmos o peso dos animais do grupo controle destes pesquisadores com os observados no presente trabalho, podemos constatar que os resultados foram semelhantes (28,1 e 26,6 g, respectivamente), indicando desenvolvimento normal para a linhagem experimental. Não há relatos na literatura de modelos de SM alimentados com dieta HF sem

desenvolvimento de obesidade, semelhante ao descrito no presente trabalho, indicando a validação de um novo modelo murino para SM. Lin e Colaboradores<sup>17</sup> estudando obesidade e desenvolvimento de resistência à leptina na mesma linhagem de camundongos realizou avaliação do comprimento tibial para averiguação do crescimento dos animais. O resultado observado também não apresentou diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que não há comprometimento de crescimento nestes animais independente do desenvolvimento ou não do aumento de peso quando alimentados com dieta HF.

Por sua vez, a diferença no peso hepático observada entre os grupos experimentais indica que o grupo HC apresentou menor desenvolvimento hepático, o que por si só já pode representar prejuízo funcional. Além disso, o menor tamanho do órgão pode estar relacionado ao padrão cirrótico observado (Figuras 2 e 6). Em nosso estudo, o peso absoluto médio dos órgãos do grupo CT foi semelhante ao observado por DeLeve e Colaboradores<sup>16</sup> no grupo controle com a mesma linhagem de camundongos, acompanhados por período semelhante e bem menor que nos animais acompanhados por Biddinger e Colaboradores<sup>18</sup> durante dezoito semanas, corroborando os dados apresentados por esses autores para peso corporal.

Com relação aos resultados observados na avaliação dos marcadores de função hepática, há uma indicação de que houve um prejuízo funcional no órgão dos animais HC, deflagrado com aumentadas atividades dos referidos marcadores de lesão. Com relação à enzima ALT, esta é o marcador de lesão hepática mais específico, sendo a sua produção e atividade associadas estreitamente a função do fígado. Em casos de lesão nos hepatócitos, esta aminotransferase é liberada na circulação em níveis aumentados sugerindo a referida lesão. Estes achados corroboram com os de DeLeve e Colaboradores<sup>16</sup> observaram diferenças entre as atividades desta enzima em camundongos com obesidade induzida por dieta HF. Contudo, o aumento no grupo *high fat* foi de 12 vezes comparado ao controle. Acredita-se que isto possa ser devido à obesidade desenvolvida pelos camundongos, diferentemente dos animais

HC do presente estudo que se apresentam como modelo de SM sem obesidade corporal. Em relevância, é seguida pela AST como marcador de agravo hepático. Contudo, esta última também é investigada em outros casos de lesão tecidual, a exemplo da miocárdica aguda. Em nosso estudo, observou-se um aumento superior a 2,5 vezes em relação ao grupo CT. Semelhantemente ao observado na investigação descrita para ALT, DeLeves e Colaboradores<sup>16</sup> observaram diferença entre os dois grupos tratados, mas a elevação nos níveis de AST nos animais *high fat* foi cinco vezes maior. A ALP, apesar de menos específica, é investigada pois pequenos aumentos em sua atividade são encontrados na doença hepática em geral. O resultado observado pode ser associado à possível lipotoxicidade advinda da alimentação com a dieta oferecida aos animais HC, na qual o percentual calórico advindo de gordura é de aproximadamente 60 % contra os 14 % apresentados pela dieta *chow* do grupo CT. Como pode ser observado, os níveis de PTNs e albumina apresentaram-se semelhantes entre os grupos. O resultado observado pode ser devido ao fato de que a síntese protéica foi prioritariamente mantida já que o fígado é o principal sítio deste anabolismo ou ainda que o grau de lesão tecidual não foi suficiente para desregular a síntese das mesmas.

Com relação aos parâmetros lipídicos, relatos da literatura mostram que indivíduos diabéticos podem apresentar dislipidemia iniciada com alteração no metabolismo da lipoproteína VLDL, o que pode induzir a um aumento sérico de IDL e LDL. Além disso, nestes indivíduos a captura hepática de VLDL, IDL e LDL pode estar diminuída, resultando em concentrações séricas elevadas<sup>6</sup>. A análise do conteúdo hepático destas frações lipídicas pode ser diferente da observada nas avaliações séricas devido a estes mecanismos de efluxo e captura hepática. O conteúdo total de lipídeos hepáticos por miligrama de tecido (Figura 4A) não apresentou diferença entre os grupos. Entretanto, os teores de TG, COL, VLDL e HDL apresentaram-se elevados no grupo HC, com diferença estatística em comparação ao CT ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o conteúdo da fração LDL não se apresentou diferente (Figura 4E),



o que pode ser devido tanto a alterações no reconhecimento dessas partículas por seu receptor hepático como às alterações possivelmente sofridas no metabolismo de lipoproteínas.

Biddinger e Colaboradores<sup>18</sup> trataram camundongos C57BL/6J e 129S6/SvEvTac com dieta *high fat* e encontraram conteúdos hepáticos de triglicerídeos e colesterol aumentados em quatro e sete vezes, respectivamente. O acúmulo lipídico observado por estes autores foi confirmado histologicamente. Outro estudo, utilizando ratos Sprague-Dawley alimentados por três dias com dieta HF também apresentou conteúdo hepático de triglicerídeos significativamente aumentados com relação aos controles alimentados com dieta *chow*<sup>19</sup>. A atividade da enzima glicogênio sintase foi medida por estes autores e mostrou-se que a ação da insulina sobre o aumento na atividade desta enzima estava diminuída. Além disso, observou-se nestes animais acentuada resistência à insulina, indicando como a dieta pode ter seus efeitos rapidamente observados.

Na avaliação do estado redox tecidual pode ser observado um aumento estatisticamente significativo nos níveis de peroxidação lipídica nos animais do grupo HC, indicando desbalanço no estado redox local. Resultado semelhante foi observado por Feillet e Colaboradores<sup>20</sup> em ratos Wistar alimentados com dieta HF. Segundo Romero e Colaboradores<sup>21</sup>, a presença de níveis elevados de glicose sanguínea em modelos diabéticos está associada à coexistência de altos níveis de peroxidação lipídica avaliada pelo método TBARS. Em estudos realizados em nosso laboratório, a investigação dos níveis glicêmicos de jejum nos animais do grupo HC mostrou-se elevada (dados não ilustrados). Contrariamente, Furukawa e Colaboradores<sup>22</sup> não encontraram alterações nos níveis de peroxidação lipídica hepática em camundongos KKAy que exibem severa obesidade, hiperlipemia e RI, quando comparados a camundongos C57BL/6J usados como controles.

Investigando-se as principais enzimas componentes da manutenção de um equilíbrio redox, SOD e CAT, observou-se comprometimento na atividade apenas desta última. A SOD

catalisa a reação de neutralização de  $O_2^{\cdot -}$ , sendo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) um produto desta reação. O estudo de Feillet-Coudray e Colaboradores<sup>20</sup> não apresentou alteração na produção de  $O_2^{\cdot -}$ . Além disso, estes autores não observaram nenhuma mudança na expressão das subunidades p22phox e p47phox de NADPHox no fígado de ratos alimentados com dieta contendo altos níveis de sacarose e gordura. Resultados semelhantes foram observados por Furukawa e Colaboradores<sup>22</sup> quando investigaram os níveis de expressão de RNAm para NADPHox no tecido adiposo branco de camundongos KKAY. Além disso, a atividade de SOD no estudo destes autores, semelhantemente aos resultados observados no presente estudo, não apresentou diferença quando comparados ao grupo controle. Desta maneira, é possível que o conteúdo local de  $O_2^{\cdot -}$  não seja suficiente para esgotar a capacidade enzimática de SOD. Além disso, o  $O_2^{\cdot -}$  pode reagir com espécies reativas originadas na peroxidação lipídica, como, por exemplo, com os radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), contribuindo para a diminuição local de  $O_2^{\cdot -}$ . Assim, estes eventos podem configurar como os possíveis mecanismos pelos quais não foi observada alteração na atividade enzimática de SOD no tecido hepático do modelo investigado.

Contrariamente, a atividade da enzima catalase pode ser exacerbadamente necessária para a neutralização de  $H_2O_2$ , cujo conteúdo pode estar aumentado no contexto oxidativo local observado devido aos elevados níveis de peroxidação lipídica e como produto da neutralização de  $O_2^{\cdot -}$ . O próprio  $H_2O_2$  pode agir como agente peroxidativo, afetando a atividade de sua enzima sequestrante. Além disso, atividade de CAT diminuída, colabora para o aumento nos níveis de  $H_2O_2$  que, por sua vez, pode contribuir para a peroxidação lipídica tecidual<sup>23</sup>.

Com relação aos achados histológicos, estes corroboram os resultados observados nas

investigações realizadas, especialmente relativos ao aumentado conteúdo de triglicerídeos hepáticos. Relato da literatura mostrou que ratos Wistar alimentados com dieta rica em gordura e sacarose apresentaram infiltração gordurosa nos hepatócitos caracterizada por volumosos vacúolos lipídicos que provocaram distensão celular e deslocamento do núcleo e citoplasma<sup>20</sup>. Em outro estudo, camundongos C57BL/6J, alimentados por dieta *chow* durante dezoito semanas apresentaram arquitetura hepática normal, semelhante aos achados do presente trabalho<sup>18</sup>. Por outro lado, os animais alimentados com dieta *high fat* mostraram profunda esteatose com acúmulo macrovesicular de gordura. Contrariamente, os achados histológicos observados no presente estudo mostraram infiltração celular nos hepatócitos dos animais HC caracterizados, principalmente, por pequenos e numerosos vacúolos, mas sem evidências de deslocamento do núcleo. DeLeve e Colaboradores<sup>16</sup> utilizando um modelo de síndrome metabólica com obesidade em camundongos C57BL/6J, através de dieta HF, aplicada durante sete meses, observaram o desenvolvimento de esteatohepatite e fibrose, característicos de doença hepática gordurosa avançada. A avaliação permitiu concluir ainda que quanto maior o tempo de exposição dietética, maior o grau de alterações metabólicas e histológicas. As observações obtidas no presente trabalho mostraram, nos animais HC, inúmeros focos inflamatórios e fibróticos, característicos de doença hepática avançada, o que não foi observado nos animais do grupo CT. Segundo Pereira e Colaboradores<sup>24</sup>, o comprometimento sistêmico induzido pela RI pode culminar com um desequilíbrio na fisiologia normal do sistema renina-angiotensina (SRA), contribuindo para a instalação e progressão do processo fibrótico tecidual. Há evidências de que o SRA pode estar envolvido no processo de fibrose hepática através da ativação dos receptores tipo 1 pela angiotensina II (Ang II). Esta sinalização induz contração e proliferação de células estreladas hepáticas (HSCs; *hepatic stellate cells*) e aumenta a expressão de colágeno I. A fibrogênese hepática é mediada pelas HSCs e os produtos da peroxidação lipídica originados de estresse oxidativo

são importantes ativadores destas células e, portanto participam no processo fibrótico<sup>16</sup>.

Em suma, o componente hepático do modelo murino dietético para síndrome metabólica estudado apresenta alterações em seu perfil morfológico, funcional e no balanço redox.

## **AGRADECIMENTOS**

A técnica Fátima Maia pelo corte e montagem das lâminas histológicas. O presente trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq e CAPES. Os autores declaram a inexistência de conflito de interesses.

## **REFERÊNCIAS**

1. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006; 40:S17-S29.
2. Kotronen A, Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology*. 2007; 27:27-38.
3. Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2007; 13(26):3540-3553.
4. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2002; 16(5):663-678.
5. Agrawal S, Bonkovsky HL. Management of nonalcoholic steatohepatitis. An analytic review. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2002; 35(3):253-261.
6. Adiels M, Olofsson S, Taskinen M, Borén J. Overproduction of very low-density

lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thombosis & Vascular Biology*. 2008; 28:1225-1236.

7. Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circulation Researcher*. 2005; 96:1178-1184.

8. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International Journal Experimental Pathology* 2006; 87:1-16.

9. Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Parkington HC, Head GA, Evans RG. Endothelial dysfunction and arterial pressure regulation during early diabetes in mice: roles for nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2007; 293:R707-R713.

10. Cong W, Tao R, Tian J, Liu G, Ye F. The establishment of a novel non-alcoholic steatohepatitis model accompanied with obesity and resistance in mice. *Life Sciences*. 2008; 82:983-990.

11. Bradford MM. An rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-254.

12. Folch J, Lees M, Stanley S. A simple method for the isolation and purification os total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1956; 226:497-509.

13. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma withoutnuse of the ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972; 18:499-502.

14. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camego G. Lipoprotein oxidation and measurements of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*. 1993; 208:10-15.

15. Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgereit J, Bader M, Santos RAS, Alenina N. Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2008; 2:418-424.
16. DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Atkinson RD, McCuskey RS. Prevention of hepatic fibrosis in a murine model of metabolic syndrome with nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Pathology*. 2008; 173:993-1001.
17. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J mice. *International Journal of Obesity*. 2000; 24:639-646.
18. Biddinger SB, Almind K, Miyazaki M, Kokkotou E, Ntambi JM, Kahn CR. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2005; 54:1314-1323.
19. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(31):32345-32353.
20. Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effects of polyphenols: involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46:624-632.
21. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, Caldwell RB, Caldwell RW. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circulation Research*. 2008; 102:95-102.
22. Furukawa S, Fugita T, Shimabukuru M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal Clinical Investigation* 2004; 114:1752-1761.

23. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43(1):61-68.
24. Pereira RM, Santos RAS, Teixeira MM, Leite VHR, Costa LP, Dias FLC, Barcelos LS, Collares GB, Silva ACS. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of angiotensin-(1-7). *Journal of Hepatology*. 2007; 46:674-681.





## 10 Termo de sigilo

Ao participar como ouvinte da defesa de dissertação da aluna do programa de Mestrado em Nutrição desta Instituição, Glaucevane da Silva Guedes, intitulada “Estudo hepático de um modelo murino dietético para síndrome metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço redox”, reconheço seu caráter confidencial e firmo-me abaixo com o compromisso de manter sob sigilo e não divulgar sob nenhuma forma (escrita, oral ou por meio de qualquer mídia) nenhuma das informações científicas ou não, veiculadas pela banca examinadora ou pela apresentadora.

UFAL, Maceió, 28 de abril de 2009.

Nome completo e CPF: \_\_\_\_\_