

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAPHAELLA CHICORSKI

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE ESTUDO DE ESTEATOSE HEPÁTICA
ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS: INTERAÇÃO ENTRE ÁLCOOL E DIETA NO
ESTABELECIMENTO DA DOENÇA**

CURITIBA
2012

RAPHAELLA CHICORSKI

**CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE ESTUDO DE ESTEATOSE HEPÁTICA
ALCOÓLICA EM CAMUNDONGOS: INTERAÇÃO ENTRE ÁLCOOL E DIETA NO
ESTABELECIMENTO DA DOENÇA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco.
Co-orientador: MSc. Francislaine Aparecida dos Reis Lívero Vieira.

CURITIBA
2012

Aos meus pais, exemplos de humildade, determinação,
educação, generosidade, honestidade e amor.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Aos meu pais pelo amor dedicado, educação, incentivo e apoio em todos os momentos necessários.

Ao meu único irmão pela amizade e companheirismo prestados ao decorrer de logos anos.

À toda a minha família pela compreensão e carinho sem medidas.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco, por seu apoio, paciência e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos.

À minha co-orientadora, MSc. Francislaine Aparecida dos Reis Lívero Vieira, pelo grande incentivo e apoio, pela ajuda profissional e pessoal e, acima de tudo, pela amizade, carinho e atenção.

Ao meu namorado pelo constante companheirismo, amizade, incentivo, apoio e amor dedicados.

A todas as minhas amigas/irmãs de infância. Juntas construímos conhecimentos e atravessamos obstáculos e dúvidas.

Às minhas amigas e companheiras de apartamento, que dividiram comigo vitórias e fracassos, certezas e incertezas, momentos alegres e tristes, e me proporcionaram dias incríveis e inexplicáveis.

Aos meus amigos e colegas de laboratório e faculdade pela ajuda, apoio e amizade.

A todos os professores que participaram e que de alguma forma atuaram como exemplos positivos para a minha formação pessoal e profissional.

A todos os animais que permitiram a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma sempre manifestaram o seu apoio, encorajamento e disponibilidade.

“Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser, e devo ter paciência. Mas aprendi também que posso ir além dos limites que eu próprio me coloquei. Aprendi que preciso escolher entre controlar meus pensamentos ou ser controlado por eles. Que certas pessoas vão embora de qualquer maneira, mesmo que desejemos retê-las para sempre. Aprendi que é difícil traçar uma linha entre ser gentil, não ferir as pessoas, e saber lutar pelas coisas em que eu acredito.”

William Shakespeare

RESUMO

A esteatose hepática alcoólica (EHA) é definida como o acúmulo de lipídios no fígado ou “fígado gorduroso” e é uma característica patológica comum da metabolização hepática comprometida decorrente do consumo crônico de etanol. Embora considerada benigna e reversível, a esteatose é um fator de risco para o desenvolvimento de enfermidades hepáticas avançadas, incluindo esteatohepatite e cirrose. A princípio, a esteatose resulta do desequilíbrio no metabolismo de lipídeos, com diminuição da oxidação lipídica e síntese de triglicerídeos aumentada. Os mecanismos pelos quais o etanol induz esteatose são multifatoriais, estando envolvidos na sua patogênese a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), a lipoperoxidação e a deficiência proteica ou má-nutrição. A proposta deste trabalho é estabelecer um modelo de estudo para a EHA e assim compreender a interação entre o etanol e a dieta no desenvolvimento da doença. Foram utilizados 24 camundongos machos Swiss adultos provenientes do biotério do SCB da UFPR (protocolo CEEA nº 438), separados inicialmente em dois grupos (n=12) de acordo com as dietas sólidas recebidas, contendo ração hipoproteica (6% de proteína) ou normoproteica (23% de proteína). Os mesmos foram divididos novamente em dois grupos conforme a dieta líquida recebida, contendo etanol 10% ou água, e acompanhados por 6 semanas. Ao término deste período os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (i.p.) para colheita de sangue e fígado. Ensaios de bioquímica plasmática (Alanina aminotransferase – ALT e Aspartato aminotransferase – AST), de estresse oxidativo hepático (Superóxido Dismutase – SOD; Catalase – Cat; e Lipoperoxidação – LPO) e histologia foram realizados. Foram encontradas alterações nos níveis de ALT e AST decorrentes do tratamento e ação tóxica do etanol e também da administração da dieta no grupo hipoproteico, não havendo alterações significantes no grupo normoproteico. Os níveis de SOD e Catalase sofreram redução significativa no grupo tratado com álcool e dieta hipoproteica, redução apontada como sendo resultante da dieta e do tratamento com álcool. Os níveis de SOD foram maiores no grupo álcool-normoproteico, não apresentando alterações significativas na atividade da Cat. Já os níveis de LPO aumentados no grupo tratado com álcool e dieta hipoproteica foram apontados como sendo resultado da ação da dieta e do etanol. No grupo normoproteico, as taxas de LPO não foram diferentes estatisticamente entre os grupos água e álcool. A análise histológica do grupo hipoproteico tratado com etanol evidenciou acúmulo micro e macrogoticular de gordura nos hepatócitos, que atingiu de 10 a 50% da área do corte, e algumas vezes mais de 50%. Nas lâminas do grupo tratado com dieta hipoproteica e água também foram encontrados mínimos acúmulos de gordura, decorrentes da dieta. Já na análise histológica dos grupos normoproteicos não foram encontrados indícios de acúmulos de gordura. As diferenças obtidas nas análises de bioquímica plasmática, estresse oxidativo e na histologia corroboram a interação positiva entre etanol e deficiência de proteína na dieta no desenvolvimento da esteatose hepática.

ABSTRACT

The alcoholic liver steatosis (EHA) is defined as the accumulation of lipids in the liver, or "fatty liver", and it is a common pathological feature of liver metabolism compromised due to chronic ethanol consumption. Although considered benign and reversible, steatosis is a risk factor for the development of advanced liver disease, including cirrhosis and steatohepatitis. In principle, the steatosis is the result of the imbalance in the metabolism of lipids, with decreased lipid oxidation and increased triglyceride synthesis. The mechanisms by which ethanol induces steatosis are multifactorial, being involved in its pathogenesis the excessive production of reactive oxygen species (oxidative stress), lipid peroxidation and protein deficiency or malnutrition. The purpose of this work is to establish an animal model for the EHA and so understand the interaction between ethanol and the diet on the development of the disease. Twenty-four (24) Swiss male mice from animal house of SCB of UFPR (CEUA Protocol No. 438) were used. Initially, the mice were separated in two groups (n=12) according to the solid diets containing: hypoproteic chow (6% of protein) or normoproteic chow (23% of protein). The animals were divided again into two groups (n=6) as the liquid diet: containing 10% of ethanol or water during 6 weeks. At the end of this period, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (i.p.) for collecting blood and liver. Plasma biochemical tests (alanine aminotransferase - ALT and aspartate aminotransferase - AST), hepatic oxidative stress (Superoxide Dismutase - SOD; Catalase - Cat; and lipid peroxidation - LPO) and liver histology were performed. Changes in the plasmatic ALT and AST were found, arising from the treatment and toxic action of ethanol and also of administration of diet in the hypoproteic group, but it was not found direct influence of diet in these changes, with no significant variations into the normoproteic groups. The levels of SOD and Catalase were significantly lower in the group treated with alcohol and hypoproteic diet. This reduction was pointed as resulting from treatment with diet and alcohol. SOD levels were higher in the alcohol normoproteic group. LPO levels have increased in the group treated with alcohol and hypoproteic diet, as a result of the combined action between diet and ethanol. However, the LPO rates were not statistically different between the normoproteic groups fed to water or alcohol. Histological analysis of hypoproteic animals treated with ethanol showed micro and macro fat accumulation in hepatocytes, which reached from 10 to 50% of analyzed areas, and sometimes more than 50%. In the group fed to hypoproteic diet and water also minimum fat accumulations were found, resulting from the diet. Inversely, in the hepatic histological analysis of normoproteic mice no none evidence of fat accumulations was found. The differences in plasma biochemical analyses, oxidative stress and the positive interaction between histology corroborate the ethanol and protein deficiency in the diet on the development of hepatic steatosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	ETANOL: CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS E SOCIAIS.....	8
1.2	METABOLISMO DO ETANOL E SUAS CONSEQUÊNCIAS.....	9
1.3	ESTEATOSE HEPÁTICA ALCOÓLICA	14
1.4	NUTRIÇÃO, ETANOL E ESTEATOSE HEPÁTICA ALCOÓLICA.....	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	21
3.2	BIOQUÍMICA PLASMÁTICA.....	22
3.3	ESTRESSE OXIDATIVO	22
3.4	HISTOLOGIA.....	23
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4	RESULTADOS	24
4.1	PESO CORPORAL E CONSUMO DE LÍQUIDOS E RAÇÃO.....	24
4.2	BIOQUÍMICA PLASMÁTICA.....	25
4.3	ESTRESSE OXIDATIVO	26
4.4	HISTOLOGIA	28
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 ETANOL: CONSEQUÊNCIAS CLÍNICAS E SOCIAIS

O abuso no consumo de álcool e a sua dependência são problemas que afetam mais de 25 milhões de brasileiros e representam um dos maiores problemas de saúde pública tanto no Brasil como no resto do mundo (CARLINI *et al.*, 2007).

O álcool é a substância psicoativa de maior uso no Brasil, devido a vários fatores, principalmente o fato de ser uma droga lícita, socialmente aceita, ter fácil acesso e baixo preço. Em nosso país são observados mais dependentes de álcool no sexo masculino, via de regra em idade produtiva, com 12 a 65 anos (CARLINI *et al.*, 2007). Assim, as consequências diretas e indiretas do consumo de álcool, como acidentes, violência e perda de produtividade, geram grandes prejuízos econômicos (WHO, 2002).

Paralelas aos problemas sociais desencadeados pelo uso abusivo de álcool, diversas complicações clínicas acometem os indivíduos que fazem de seu uso uma constante. O etanol induz efeitos deletérios sobre o trato gastrointestinal, sistema nervoso, cardiovascular, hematológico e reprodutor. Pode também levar a complicações psiquiátricas, como quadros psicóticos, depressão, síndrome de abstinência, síndromes demenciais, distúrbios de ansiedade e, ainda, à síndrome fetal alcoólica quando consumido por gestantes (SILVEIRA & MOREIRA, 2006).

Dentre os graves problemas clínicos desencadeados pelo uso abusivo de álcool estão as doenças hepáticas, pois o fígado é o principal local do metabolismo do etanol, sendo alvo de seus próprios metabólitos reativos, principalmente do acetaldeído (HENZEL *et al.*, 2004). O consumo de álcool é o maior fator etiológico em doenças crônicas do fígado em todo o mundo, causando “fígado gorduroso” ou esteatose hepática, hepatite alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular (WILLIAMS, 2006).

1.2 METABOLISMO DO ETANOL, ESTRESSE OXIDATIVO E OUTRAS CONSEQÜÊNCIAS

A administração de etanol leva a diversas mudanças estruturais, funcionais e interrompe processos metabólicos em humanos e animais de experimentação. O fígado é um dos tecidos mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do etanol visto que é o primeiro local de seu metabolismo (HENZEL *et al.*, 2004).

O etanol atinge todos os tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais, por ser uma molécula pequena e solúvel tanto em meio aquoso como lipídico. O etanol absorvido deverá ser oxidado visto que o álcool não pode ser armazenado. Esta oxidação do álcool ocorre quase em sua totalidade em nível hepático. A primeira fase da biotransformação do etanol compreende sua oxidação a acetaldeído. No hepatócito, esta transformação é realizada através de três caminhos distintos: a) via álcool desidrogenase, no citosol ou na parte solúvel da célula; b) via sistema microssomal de oxidação do etanol, localizada no retículo endoplasmático; ou c) via catalase, localizada nos peroxissomos (JORDÃO *et al.*, 1998).

Durante o consumo de quantidades moderadas de etanol há maior envolvimento da enzima álcool desidrogenase. Essa é a via de metabolização clássica, catalisada por essa enzima para formar acetaldeído e tendo como resultado a geração de radicais livres (CEDERBAUM, 1991; KUKIELKA, DICKER, & CEDERBAUM, 1994; MANTLE & PREEDY, 1999). O processo através da álcool desidrogenase (ADH), localizada no citosol, utiliza como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é convertida a sua forma reduzida (NADH). A oxidação do etanol determina, assim, considerável produção de NADH e uma redução do $\text{NAD}^+ + \text{H}^+$ livre. A alteração deste sistema redox, com aumento da relação NADH/NAD é responsável por alterações metabólicas decorrentes do consumo do etanol, tais como o aumento do α -glicerofosfato hepático e o estímulo à síntese de ácidos graxos com concomitante diminuição da oxidação normal dos ácidos graxos. Desta maneira, existe uma produção maior de triglicerídeos, criando-se condições para o aparecimento da esteatose hepática, processo explicado com mais detalhes adiante (item 1.3). De modo diferenciado, o tratamento crônico com etanol leva à oxidação do álcool pelo sistema microssomal, com participação primordial do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) (JORDÃO *et al.*, 1998).

A segunda fase da oxidação do etanol ocorre a partir da formação do acetaldeído, com a formação de acetil-CoA e acetato. A transformação do acetaldeído para acetato é praticamente irreversível. A oxidação do acetaldeído ocorre através da aldeído desidrogenase, enzima que possui alta atividade mitocondrial. A formação de acetil-CoA aumenta as chances de instalação da esteatose hepática (JORDÃO, *et al*, 1998).

No entanto, a maior parte dos derivados de oxigênio, produzidos nos microsossomos, ocorre pela indução da CYP2E1, pois esta isoenzima pode ser induzida pelo etanol e outros alcoóis e acetona, com capacidade para gerar O_2^- (ânion superóxido) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JORDÃO *et al*, 1998). Além disso, a atividade da CYP2E1 é induzida não só pelo etanol, mas também por ácidos graxos (LIEBER, 2004).

Além da geração de espécies reativas de oxigênio em consequência da metabolização, muitas outras etapas são descritas como contribuintes fundamentais para a geração de estresse oxidativo durante o consumo de etanol (NORDMANN, RIBIERE & ROUACH, 1992). Dentre eles, cita-se a produção do metabólito reativo acetaldeído, danos mitocondriais, efeitos diretos à membrana, hipóxia, efeitos no sistema imune, alteração na produção de citocinas, mobilização de ferro e efeitos em componentes antioxidantes, particularmente a glutathiona citosólica e mitocondrial. Muitas destas vias não são independentes umas das outras e várias contribuem para a geração excessiva de radicais livres (DEY & CEDERBAUM, 2006; TSUKAMOTO & LU, 2001; ARTEEL, 2003).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, as espécies reativas são produzidas naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS *et al.*, 2006). Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. Portanto, são caracterizados por grande instabilidade e elevada reatividade, e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (REIS *et al.*, 2008). No organismo, essas espécies encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a

peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS *et al.*, 2006).

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e as não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as espécies reativas de nitrogênio (ERN) incluem-se o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-)¹⁰. Enquanto algumas podem ser altamente reativas no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outras são reativas apenas com os lipídios. Existem ainda algumas espécies que são pouco reativas, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (BARREIROS *et al.*, 2006).

O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes produzidos no organismo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo organismo agem enzimaticamente, a exemplo da glutatona peroxidase (GPx), catalase (Cat) e superóxido dismutase (SOD), ou não-enzimaticamente a exemplo de glutatona (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido dihidrolipóico e ubiquinol (CoQH_2). Além dos antioxidantes produzidos de forma endógena, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS *et al.*, 2006).

A glutatona reduzida (GSH) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada exatamente pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão, atua como transportadora e reservatório da cisteína, e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Por causa de todas as suas funções, GSH é provavelmente o antioxidante não-enzimático mais importante presente nas células. Portanto, as

enzimas que ajudam a gerar GSH são críticas para a capacidade do organismo em se proteger contra o estresse oxidativo (FRIDOVICH, 1997).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathiona redutase (GSH-Rd), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular. A glutathiona peroxidase (GSH-Px) catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da GSH a GSSG, enquanto a catalase (Cat) é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A Cat é encontrada principalmente em peroxissomos e promove a interação do H_2O_2 com doadores de hidrogênio para que o H_2O_2 possa ser convertido em uma molécula de água e o doador reduzido possa ser oxidado (atividade peroxidativa da catalase). Compostos que podem fornecer esses átomos de hidrogênio incluem o etanol e o metanol, que são oxidados em acetaldeído e formaldeído, respectivamente (FRIDOVICH, 1997).

Superóxido dismutase (SOD) corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariotos existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente nas mitocôndrias. Esta enzima também tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Frente aos antioxidantes naturais supracitados, fica claro que o estresse oxidativo é uma situação em que há desequilíbrio entre a quantidade de pró-oxidantes e antioxidantes. Isso ocorre quando há maior produção de espécies reativas derivadas do oxigênio ou do nitrogênio, ou menor produção de antioxidantes como a catalase, glutathiona peroxidase e tioredoxina (GONÇALVES & PEREIRA, 200_) ou ainda uma combinação dos dois efeitos (CZAJA, 2007).

As espécies reativas podem agredir os hepatócitos por ação direta, interagindo com o DNA ou com os componentes das membranas. No DNA, produzem lesões nos nucleotídeos que, se inadequadamente reparadas, podem ser fator de risco para agravar a doença hepática, inclusive aumentando a chance de ocorrência do carcinoma hepatocelular. O DNA mitocondrial é particularmente

suscetível à lesão, por depleção de glutathiona, comum no alcoolista (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

Além da ação direta, alterando moléculas e produzindo lesão celular, radicais livres produzem modificações funcionais em proteínas, especialmente nas que transmitem sinais às células, ativando algumas vias e inibindo outras. Os hepatócitos podem, por exemplo, tornarem-se mais suscetíveis à apoptose ou à necrose, em razão da facilidade de ativação de vias que conduzem a esses processos (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

A ação de radicais livres é intensa também sobre os lipídeos insaturados das membranas, cuja peroxidação resulta na geração de aldeídos reativos, especialmente o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal. O acetaldeído e os aldeídos derivados da peroxidação lipídica são substâncias altamente reativas que podem se ligar com diversas proteínas celulares. As ligações com proteínas, além de produzirem alterações funcionais (por exemplo, inibição dos inativadores do complemento), facilitam a agregação e precipitação no citoplasma (formação dos corpos hialinos de Mallory) e a geração de neo-antígenos que podem desencadear auto-agressão imunitária (GONÇALVES & PEREIRA, 200_). Ainda, através da lipoperoxidação há a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Em decorrência do etanol ocorre também alteração na função dos proteossomas, modificando um mecanismo importante de degradação de proteínas intracelulares. A redução da função proteolítica dos proteossomas pode aumentar a vida média e estabilizar proteínas que favoreçam a apoptose. Pode ainda modificar o processamento de antígenos, alterando a resposta imunitária. Há aumento do estresse do retículo endoplasmático, o que aumenta o acúmulo de proteínas alteradas, favorecendo a ativação de rotas indutoras de apoptose (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

As mitocôndrias são particularmente lesadas nos hepatócitos por ação crônica do etanol. Há modificações nas proteínas mitocondriais devido à ação direta de radicais livres e da adição de acetaldeído e malondialdeído, o que, juntamente com

acil etanol ésteres, modifica a permeabilidade transicional da membrana externa, favorecendo a saída do citocromo C e outros componentes mitocondriais desencadeadores de apoptose. A elevação da produção de óxido nítrico (NO) por indução da enzima que o sintetiza (óxido nítrico sintase - NOS) aumenta sua passagem para as mitocôndrias, onde inibe a citocromo oxidase, diminuindo a produção de ATP e favorecendo a produção de radicais livres do oxigênio e do NO (NOO*, radical peroxinitrito). Se a lesão das proteínas mitocondriais comprometer profundamente a síntese de ATP, haverá necrose (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

Hipóxia relativa ocorre no uso crônico de álcool, devido ao aumento do consumo de oxigênio pelas células hepáticas, sobretudo na região centrolobular, onde se verifica maior concentração do CYP2E1 e maior metabolização do etanol. Embora o etanol amplie o fluxo sanguíneo, tal aumento não compensa a demanda maior de oxigênio, agravada pela lesão mitocondrial e pela inativação parcial da monofosfato de adenosina quinase (AMPK), responsável por induzir os principais mecanismos de adaptação à falta de oxigênio. Desse modo a região central fica mais vulnerável à hipóxia, o que favorece o dano celular, inclusive a necrose hialina centrolobular (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

Sabe-se também que o etanol modula a expressão e a atividade de várias moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição em monócitos e células de Kupffer (WHEELER & THURMAN, 2003). A ativação das células de Kupffer por endotoxinas está envolvida na lesão hepática induzida por etanol. Enquanto a tolerância dessas células é observada nas fases iniciais de consumo de etanol, a sensibilização das mesmas é observada tardiamente. Tanto a tolerância quanto a sensibilização das células de Kupffer são induzidas por endotoxinas derivadas do intestino (YAMASHINA *et al.*, 2005). O consumo crônico de etanol torna as células de Kupffer hipersensíveis às endotoxinas, o que resulta na produção de citocinas inflamatórias e do fator de necrose tumoral α (TNF α), via receptor toll-like 4 (TLR4), levando à inflamação e necrose hepática (NATH & SZABO, 2009).

1.3 ESTEATOSE HEPÁTICA ALCOÓLICA

A esteatose hepática é definida como o acúmulo de lipídios no fígado ou “fígado gorduroso” e é uma característica patológica comum da metabolização

hepática comprometida decorrente do consumo crônico de etanol (BREITKOPF *et al.*, 2009; ARTEEL *et al.*, 2003). Embora considerada muitas vezes benigna e reversível, a esteatose é um fator de risco para o desenvolvimento de enfermidades hepáticas avançadas, incluindo esteatohepatite e fibrose. As alterações nos hepatócitos que acompanham o início de esteatose ainda não estão claramente definidas (ORLICKY *et al.*, 2011). Essa fase ocorre de forma assintomática e os pacientes têm um ligeiro aumento das transaminases, bilirrubina e fosfatase alcalina (BREITKOPF *et al.*, 2009; ARTEEL *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais o etanol induz a esteatose são multifatoriais, envolvendo efeitos no metabolismo hepático de lipídios, hipóxia e peroxidação lipídica (LIEBER, 2004; FRENCH, 1989; SOZIO & CRABB, 2008). As lesões hepáticas alcoólicas envolvem uma complexa série de distúrbios na sinalização de células do sistema imunológico, células parenquimatosas e não parenquimatosas, e múltiplos sistemas sinalizadores são afetados para promover o acúmulo de lipídios nos hepatócitos expostos ao etanol (NATH & SZABO, 2009).

A princípio, a esteatose nos hepatócitos resulta do desequilíbrio no metabolismo de lipídeos, com diminuição da oxidação lipídica mitocondrial e síntese de triglicerídeos aumentada. O estresse oxidativo induzido pelo etanol também desempenha um papel importante nos mecanismos pelos quais o etanol produz lesão hepática (DEY & CEDERBAUM, 2006). O etanol induz o aumento da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, devido a: (a) excesso de NADH⁺ originado da atividade da álcool desidrogenase e da aldeído desidrogenase; (b) aumento da expressão de enzimas lipogênicas; e (c) redução da atividade da AMPK, principal moduladora da atividade das enzimas envolvidas na lipogênese. Por outro lado, o etanol reduz a excreção das lipoproteínas, por causa das modificações das tubulinas pela adição de acetaldeído e malondialdeído, e a oxidação dos ácidos graxos, inibindo receptores nucleares (PPAR- γ e LXR) responsáveis pela indução das enzimas que favorecem a lipoxidação (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

Sabe-se, no entanto, que o acúmulo de ácidos graxos livres é problemático, pois são importantes mediadores da lipotoxicidade celular (UNGER, 2002). Os mecanismos exatos de seus efeitos citotóxicos não são claros, mas podem envolver múltiplas e independentes vias de regulação e sinalização intimamente ligadas. Dentre elas está a disfunção mitocondrial secundária à superprodução de EROS, peroxidação lipídica e estresse oxidativo (LISTENBERGER *et al.*, 2003; SANYAL,

2002). Ainda, a mobilização de ácidos graxos do plasma para a oxidação é estimulada pelo glucagon e inibida pela insulina, o que favorece o acúmulo de ácidos graxos livres (FFAs) no fígado e predispõe ao estresse oxidativo, estimulando as peroxidases lipídicas microssomais (HASHIMOTO *et al.*, 2000; REDDY & HASHIMOTO, 2001).

O tecido adiposo é também uma rica fonte de citocinas, modulando a atividade de várias células hepáticas. As duas adipocitocinas mais estudadas são a leptina e a adiponectina. A leptina reduz a esteatose e a lipotoxicidade através do aumento da sensibilidade à insulina periférica, reduzindo assim a exposição hepática aos ácidos graxos. É responsável também por importantes ações anti-inflamatórias. No entanto, a leptina promove a ativação miofibroblástica das células estreladas hepáticas, contribuindo assim com a fibrogênese. A adiponectina, por outro lado, parece ter efeitos benéficos em geral, inibindo a esteatose, a lipotoxicidade e a fibrogênese (WING-KIN SYN *et al.*, 2009). Assim, a redução nos níveis de adiponectina e/ou defeito em suas funções contribui para o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos, bem como para um aumento na síntese de triglicerídeos. Além disso, a lipogênese de novo (ou seja, o aumento na biossíntese de ácidos graxos) é outro fator que contribui para o desenvolvimento da esteatose. Este processo é regulado por fatores de transcrição ativados pela insulina, e, portanto, a hiperinsulinemia é um importante estímulo para a lipogênese de novo. Na esteatose hepática alcoólica as citocinas inflamatórias reduzem a sensibilidade dos receptores à insulina, causando indiretamente um estado de hiperinsulinemia (WING-KIN SYN *et al.*, 2009).

A necrose de hepatócitos e a inflamação representam um passo importante na progressão da doença hepática alcoólica a partir da esteatose. A necrose pode ser decorrente da agressão mitocondrial intensa pelos radicais livres e aldeídos reativos. Alguns autores admitem que os neo-antígenos gerados de proteínas modificadas pela ação de radicais livres e aldeídos possam desencadear agressão auto-imunitária aos hepatócitos. A inflamação, caracterizada pela exsudação de neutrófilos e monócitos, é decorrente da produção de citocinas e quimiocinas por hepatócitos e células de Kupffer, ativados pelos aldeídos reativos decorrentes do metabolismo do etanol e por endotoxinas (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

A absorção de endotoxinas também tem papel patogênico importante na inflamação e fibrose na hepatopatia alcoólica. O uso crônico do etanol reduz a

resposta imunitária, aumenta o número de bactérias no intestino e a permeabilidade intestinal a grandes moléculas, favorecendo a absorção de endotoxinas bacterianas. Além disso, os alcoolistas tem capacidade diminuída de neutralizar endotoxinas. Como consequência, a endotoxina elevada estimula as células de Kupffer, que produzem citocinas, especialmente o TNF- α , indutor de apoptose em hepatócitos (GONÇALVES & PEREIRA, 200_).

O diagnóstico de esteatose é feito quando o conteúdo de lipídios no fígado excede 5 a 10% do seu peso (ADAMS *et al.*, 2005). Histologicamente, a esteatose é caracterizada pelo acúmulo de gotículas lipídicas compostas principalmente de triacilgliceróis no citoplasma dos hepatócitos (CAIRNS & PETERS, 1983). O tamanho e a distribuição lobular dessas gotículas lipídicas citoplasmáticas são variáveis, refletindo a etiologia, gravidade e duração da esteatose (ORLICKY *et al.*, 2011). Esteatose associada ao etanol instala-se inicialmente nas áreas centrolobulares (zona 3), com avanço para áreas intermediárias (zona 2) e áreas periportais (zona 1), o que ocorre com a progressão da doença (BRUNT, 2007; LEFKOWITCH, 2005).

Apesar de algumas décadas de pesquisa terem se passado, o conhecimento da hepatotoxicidade do álcool é ainda limitado (HU *et al.*, 2009). Certo progresso na patogênese dos danos hepáticos causados pelo etanol tem sido alcançado pelo estabelecimento do papel do estresse oxidativo e da resposta inflamatória neste processo (BERR *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2009), mas ainda não há medicamentos definitivos para o tratamento de doenças hepáticas alcoólicas (HENZEL *et al.*, 2004). Por esta razão, modelos de estabelecimento de EHA são importantes, pois são ferramentas farmacológicas que auxiliam em estudos para o estabelecimento de alvos terapêuticos.

1.4 NUTRIÇÃO, ETANOL E ESTEATOSE HEPÁTICA ALCOÓLICA

A redução da ingestão dietética é um dos principais componentes etiológicos da desnutrição, particularmente em pacientes alcoolistas. Como fatores agravantes nesta situação há má absorção intestinal de gorduras e o hipermetabolismo associado ao alcoolismo agudo (MAIO, DICHI & BURINI, 2000).

O abuso crônico do etanol afeta o estado nutricional e está associado com deficiências nutricionais e má-nutrição. O apetite e a qualidade da dieta dos indivíduos expostos a esse tipo de consumo são prejudicados e, além disso, há uma grande predisposição a fatores de risco nutricionais e deficiência de micronutrientes (ROSS *et al.*, 2012).

A presença do álcool constitui por si só um agravante por promover desvios de vias metabólicas aumentando o consumo energético, a produção de H^+ e as formas ativas do oxigênio (DICHI *et al.*, 1993). Paralelamente, pode existir o déficit de micronutrientes, independente da redução da ingestão energética, pela simples adição de álcool à ingestão energética usual (SARIN *et al.*, 1997), de modo independente da presença de doença hepática (GLÓRIA *et al.*, 1997). Assim, o etanol pode ser causa tanto de desnutrição primária, pelo fato de deslocar os nutrientes da dieta, como de desnutrição secundária, por ser responsável pela má absorção e agressão celular decorrentes de sua citotoxicidade direta (LIEBER, 1994).

A falta de metionina (aminoácido essencial) e de demais fatores lipotróficos (folato, B12, colina) pode ser em parte responsabilizada pela esteatose hepática. A queda na transulfuração e formação da cisteína reduz os níveis de glutathione, diminuindo, assim, parte importante da defesa antioxidante intracelular. Isto pode ser agravado pela deficiência de outros minerais, como selênio (cofator da glutathione peroxidase), zinco (cofator da superóxido dismutase) e ferro (cofator da catalase), todos deficientes em alcoolistas crônicos. Adicionalmente, os níveis das vitaminas antioxidantes (vitamina C e E e betacaroteno) são alterados em alcoolistas, pois além da má absorção intestinal, os níveis de alfa-tocoferol são influenciados pela desnutrição proteico-energética, menor estocagem hepática, degradação aumentada pelo hipermetabolismo e peroxidação lipídica (MAIO *et al.*, 2000).

Durante décadas, as deficiências dietéticas foram consideradas o maior fator responsável pelo desenvolvimento de doença hepática em alcoolistas. Tem sido reportado que uma dieta pobre em carboidrato associada ao etanol induz hepatotoxicidade mais severa, com intensa esteatose (KOROURIAN, 1999). Em contraste, a suplementação com proteína de soja parece melhorar o acúmulo de lipídeo induzido pelo etanol (YANG *et al.*, 2012). Uma das hipóteses para explicar como a desnutrição proteica associada com o álcool interfere no metabolismo do fígado é que com a falta de proteínas ocorre diminuição da atividade da enzima

álcool desidrogenase, principal enzima envolvida na degradação do etanol. Consequentemente, a eliminação deste é retardada, expondo, portanto, os órgãos-alvo por mais tempo a níveis mais elevados de etanol (SILVA & MCLEAM, 1988).

Entretanto, ainda há pouca informação a respeito do efeito da quantidade, qualidade e composição protéica na patofisiologia da doença hepática alcoólica e não alcoólica (MEGHELLI-BOUCHENAK *et al.*, 1989; LOCKWOOD *et al.*, 1977), sendo esta uma das razões pelas quais se propôs este estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esta proposta objetiva estabelecer em nosso laboratório um modelo de estudo *in vivo* para a esteatose hepática alcoólica utilizando diferentes dietas, a fim de comparar os efeitos e a interação destas com o álcool.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar o nível plasmático das enzimas ALT e AST, como biomarcadores da lesão hepatocelular;

2. Investigar as implicações do estresse oxidativo na EHA, através de medidas dos níveis de peroxidação lipídica (LPO), além das atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD) e catalase (Cat);

3. Avaliar as alterações morfológicas hepáticas, através de colorações histológicas (H&E e Azul do Nilo);

4. Mensurar o consumo de ração e de líquidos em grupos de animais que recebem dieta hipoproteica ou normoproteica;

5. Avaliar a variação de peso corporal ao longo do tratamento;

6. Estabelecer correlações entre dieta hipoproteica e normoproteica, o consumo crônico de álcool e o estabelecimento de esteatose hepática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Estudos em animais têm provido dados em vários mecanismos inter-relacionados que contribuem para o desenvolvimento de doenças alcoólicas hepáticas (CRABB, 1993). Assim, inicialmente se tentou estabelecer um modelo *in vivo* de EHA, através do consumo de etanol. Este trabalho de conclusão de curso é parte de um projeto maior, cujos procedimentos foram aprovados pelo CEEA – SCB, sob número 438.

Para a implantação do modelo, foram utilizados 24 camundongos machos Swiss (8-10 semanas de idade), pesando entre 25 e 35 g, mantidos em gaiolas individuais, devidamente adaptados às condições ambientais locais (temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas) e provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Baseando-se na dieta, os animais foram separados em dois grupos contendo cada qual 12 indivíduos. Em um dos grupos os animais receberam uma dieta hipoproteica (ração com 6% de proteína¹) e em outro os animais receberam uma dieta normoproteica (ração com 23% de proteína²). Sequencialmente, cada um dos grupos foi novamente dividido em dois menores, contendo 6 animais. A partir desta divisão, foram implantadas duas dietas líquidas, uma contendo etanol 10% e outra somente água. Assim, com o delineamento do experimento, implantaram-se quatro grupos: G1) dieta normoproteica e água; G2) dieta normoproteica e etanol; G3) dieta hipoproteica e água; e G4) dieta hipoproteica e etanol.

O tratamento sucedeu-se por 6 semanas e ao término deste período, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e em seguida anestesiados com uma combinação de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Realizou-se a laparotomia para as coletas de sangue e fígado. O sangue foi colhido da veia cava caudal com seringas heparinizadas, centrifugado (3.000 rpm durante 10 minutos) e o plasma armazenado a -70°C para posteriores análises. O fígado foi rapidamente coletado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -

¹ Dieta AIN-93G 6% Peletizada, Rhostrer Indústria e Comércio Ltda. São Paulo – SP.

² Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A. Colombo – PR - Brasil.

70°C para análises de estresse oxidativo. Outra seção do fígado (lobo maior) foi devidamente armazenada em formalina tamponada para análise histológica. Ao longo do tratamento os animais foram pesados, bem como o consumo de líquidos e de ração foi mensurado semanalmente.

3.2 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA

A partir das amostras de plasma, os parâmetros bioquímicos Alanina Aminotransferase – ALT e Aspartato Aminotransferase – AST foram avaliados como indicadores de lesão hepática. O plasma foi submetido aos testes através de kits comerciais (Labtest® - Lagoa Santa, MG - Brasil), e a leitura das amostras realizada em espectrofotômetro automatizado (COBAS MIRA 1500®).

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

Na quantificação de parâmetros envolvidos no estresse oxidativo (Superóxido Dismutase – SOD; Catalase – Cat e Lipoperoxidação – LPO), as amostras de fígado foram homogeneizadas em gelo e centrifugadas a uma velocidade de 9.000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi utilizado para as análises seguindo métodos específicos: SOD através do método de oxidação do pirogallol, Cat de acordo com Aebi (1984), e taxa de peroxidação lipídica (LPO) pelo método FOX, com adaptações (Jiang *et al.*, 1991), que quantifica a formação de hidroperóxidos durante a lipoperoxidação.

Os resultados foram expressos pela quantidade de proteínas presente nos homogenatos. Para tanto, a concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.4 HISTOLOGIA

Para as análises histológicas, secções transversais do lobo direito do fígado foram colhidas e fixadas em formalina tamponada 10% para posterior coloração com hematoxilina e eosina (HE). Uma amostra adicional de fígado foi armazenada em formalina tamponada durante 3 dias, e em seguida transferida para soluções de sacarose em concentrações de 10%, 20% e 30%, permanecendo por 24 horas em cada uma destas.. Após a saturação em sacarose, as secções foram armazenadas em Tissue-Tek® (O.C.T., Sakura ®) e congeladas em -80°C, onde permaneceram até o processamento das lâminas com corante Azul do Nilo. Estas técnicas foram utilizadas para avaliar o aspecto morfológico do tecido, confirmar a presença de lipídios no tecido hepático e o estabelecimento de fato da EHA. As lâminas foram examinadas em um microscópio óptico (Leica DM2500®) quanto às alterações celulares diante do etanol.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas entre os grupos e durante as semanas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, cujas variáveis foram dieta e tratamento, seguida pelo teste de Bonferroni, sempre considerando significativo $p < 0,05$.

Nas análises dos consumos de ração e líquidos, as variáveis analisadas foram tratamento (ração + líquido) e tempo (semanas). A análise estatística e a preparação dos gráficos foram realizadas com Graphpad Prism versão 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPORAL E CONSUMO DE LÍQUIDOS E RAÇÃO

Com relação ao consumo de líquido, houve diferença entre as semanas para os quatro grupos, porém não houve variação entre os grupos, ou seja, o consumo de água e álcool não apresentou diferença significativa entre os grupos hipoproteico e normoproteico. Portanto, a dieta não influenciou o consumo de líquidos de modo expressivo, como mostrado na figura 1A.

Com relação ao consumo de ração, houve novamente diferença entre as semanas para os quatro grupos, havendo também, neste caso, diferenças entre os grupos, especialmente na 2ª e 3ª semana, onde os dois grupos que receberam dieta hipoproteica ingeriram mais ração do que os grupos que receberam ração normal. Este consumo aumentado de ração permaneceu até o final do tratamento no grupo álcool-hipoproteico (Figura 1B).

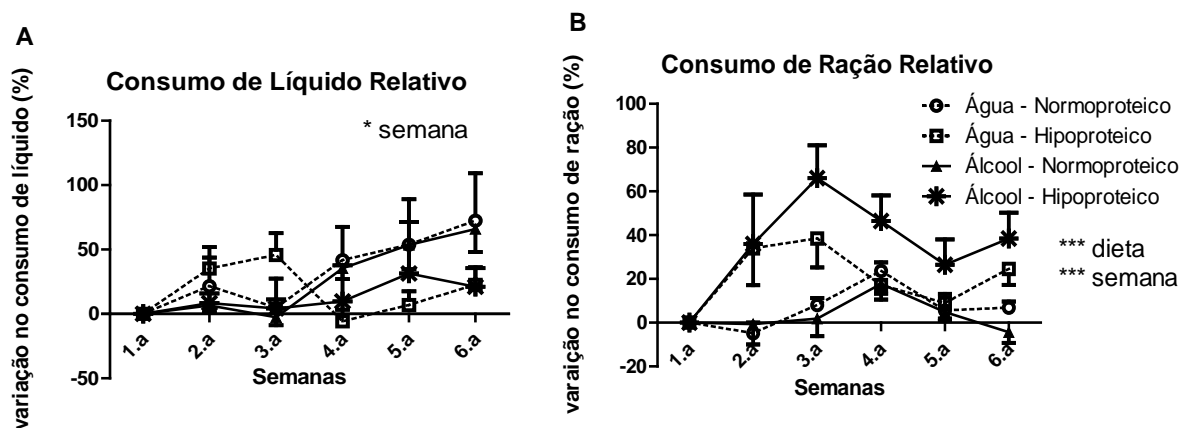


Figura 1. Consumo (% relativo à 1ª semana) de água ou álcool (A) e ração hipo- ou normoproteica (B) por camundongos Swiss ao longo de 6 semanas. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

As dietas hipoproteicas também provocaram aumento no ganho de peso. Como ocorreu no consumo de ração, o ganho de peso foi maior nos grupos hipoproteicos, independente da dieta líquida correlacionada (água ou álcool), como mostrado na Figura 2.

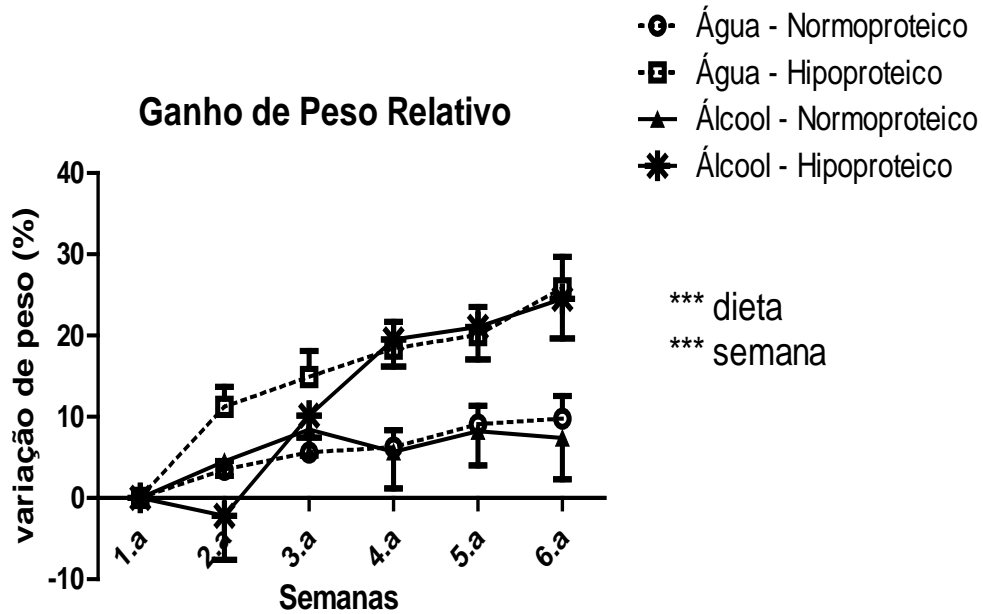


Figura 2. Ganho de peso (% , relativo à primeira semana) de camundongos submetidos a diferentes dietas líquidas e sólidas ao longo de seis semanas. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (** $p < 0,001$).

4.2 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA

Em relação à atividade das transaminases, houve um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ALT e AST no grupo alimentado com dieta hipoproteica e álcool quando comparado aos animais do mesmo grupo que receberam água. Já nos animais alimentados com uma dieta normoproteica, não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 3). As diferenças encontradas foram apontadas como sendo resultantes do tratamento com etanol e também da administração da dieta hipoproteica.

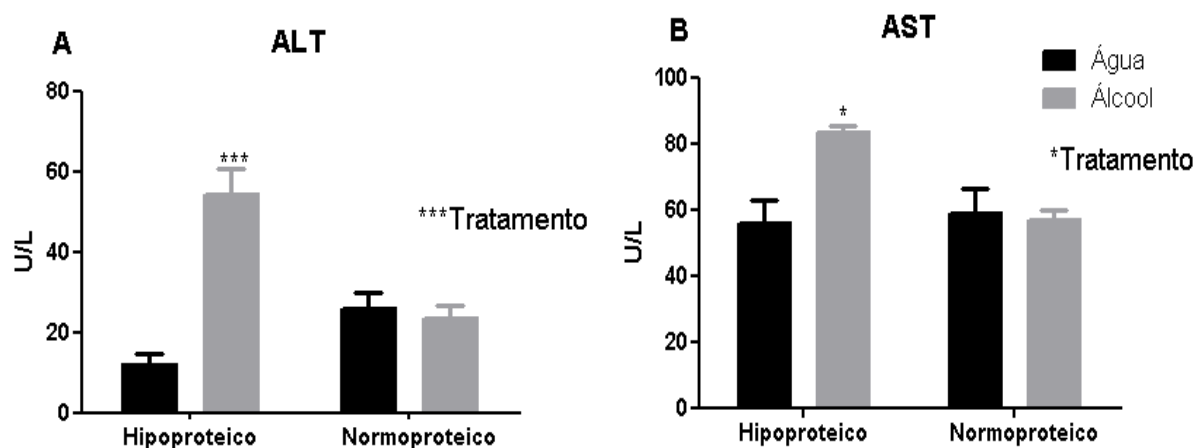


Figura 3. Nível plasmático (U/L) das enzimas ALT (A) e AST (B) em camundongos Swiss ao final de seis semanas de tratamento com ração hipo- ou normoproteica e água ou álcool. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.3 ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO

As atividades enzimáticas da Catalase (Cat) e Superóxido Dismutase (SOD) sofreram influência da dieta. Ambas foram significativamente inferiores para o grupo tratado com dieta hipoproteica e etanol quando comparadas ao grupo controle (água). No grupo tratado com dieta normoproteica, apenas a enzima SOD sofreu alteração significativa, evidenciando aumento no grupo tratado com álcool. Para a enzima Cat não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos normoproteicos (Figura 4).

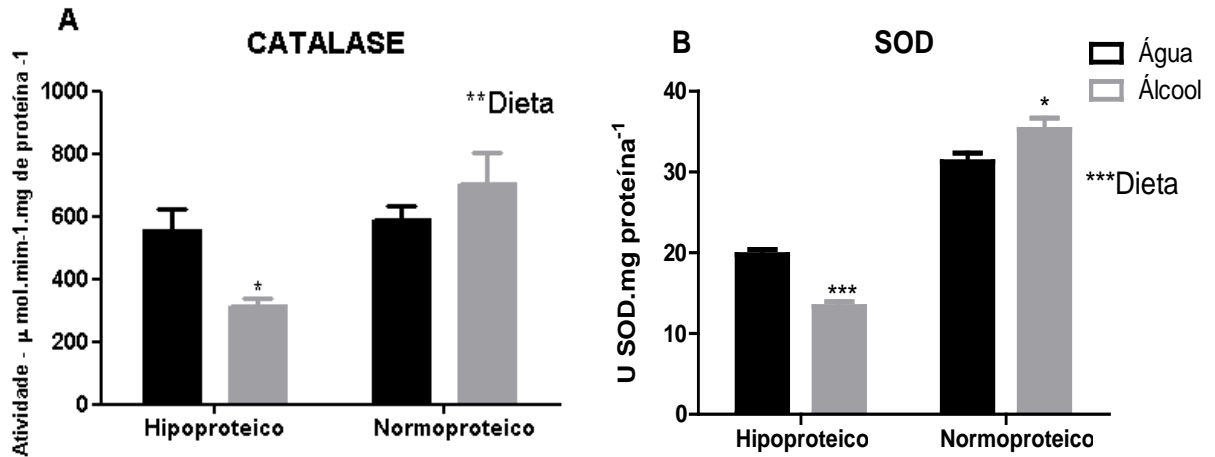


Figura 4. Atividade das enzimas Cat e SOD em homogenato hepático de camundongos Swiss ao final de seis semanas de tratamento com ração hipo- ou normoproteica e água ou álcool. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Com relação à taxa de peroxidação lipídica, foi mais uma vez encontrado um aumento significativo nos animais tratados com dieta hipoproteica e álcool, quando comparados aos animais controle (Figura 5). Novamente nos grupos tratados com dieta normoproteica não se observou diferença estatística. O efeito do álcool sobre a taxa de LPO pareceu ser mais efetivo do que o fator nutricional.

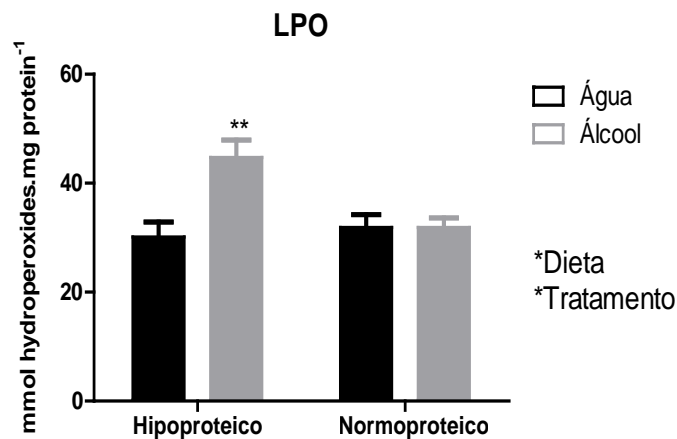


Figura 5. Nível de peroxidação lipídica hepática de camundongos Swiss ao final de seis semanas de tratamento com ração hipo- ou normoproteica e água ou álcool. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.4 HISTOLOGIA

Nas análises histológicas foram observadas alterações celulares principalmente no grupo tratado com etanol e dieta hipoproteica, sendo evidenciada tumefação celular, assim como o acúmulo micro e macrogoticular de gordura no fígado. Estas alterações representavam de 10 a 50% da área do corte, e em alguns casos mais de 50% destas. Somente o depósito macrogoticular atingiu menos de 10% da área.

Para os camundongos submetidos a uma dieta líquida regular (água) e dieta hipoproteica, tumefações celulares também foram verificadas, porém em menor nível, e os acúmulos microgoticulares estavam presentes em menos de 10% das áreas do corte, mas não foram observados acúmulos macrogoticulares. As alterações encontradas neste grupo foram decorrentes da dieta hipoproteica, outro fator importante para o estabelecimento da esteatose hepática.

Com relação aos animais tratados com dieta normoproteica, nenhuma alteração histológica foi encontrada durante a análise das lâminas, independente da dieta líquida recebida (Figura 6).

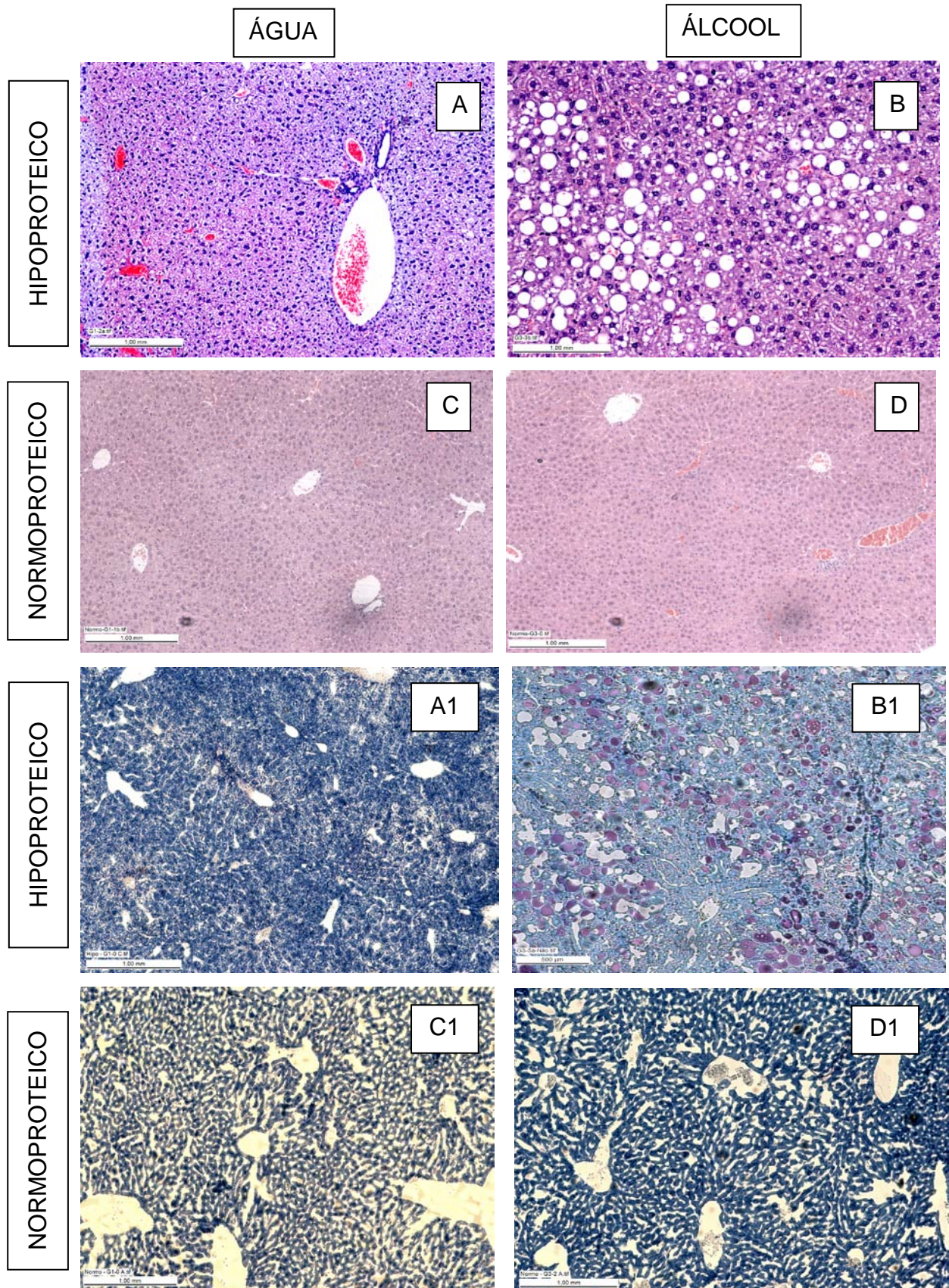


Figura 6. Histologia hepática de camundongos Swiss ao final de seis semanas de tratamento com ração hipo ou normoproteica e água ou álcool. Coloração H&E: A, B, C e D. Coloração Azul de Nilo: A1, B1, C1 e D1.

5 DISCUSSÃO

Através das mensurações semanais do consumo de líquidos (água e álcool) e ração, notou-se uma variação semanal nestes parâmetros. No entanto, não houve diferenças entre os grupos para o consumo de líquidos, não tendo a dieta uma influência expressiva. O resultado no consumo de etanol 10% foi surpreendente, pois se esperava que o sabor aversivo do etanol reduzisse o consumo, o que de fato não ocorreu.

Com relação ao ganho de peso e ao consumo de ração, praticamente os mesmos padrões foram encontrados, havendo maior consumo, e conseqüentemente maior ganho de peso nos animais, tratados com dieta hipoproteica, independente da dieta líquida vinculada. O ganho de peso nos grupos hipoproteicos apresentou-se contínuo até o final do tratamento. Sabe-se que um efeito da dieta hipoproteica já estabelecido é o aumento da gordura corporal. Ratos em crescimento tendem a aumentar o seu consumo para adequar a sua ingestão ao seu requerimento proteico, exigido para a formação de tecidos magros (WEBTER, 1993). Provavelmente esta é a explicação para os resultados encontrados neste trabalho.

Considerando os efeitos do etanol sobre o fígado, amplamente comentados no início deste trabalho, mensurou-se o nível plasmático das transaminases AST e ALT como indicadores da integridade de hepatócitos. Ambas as enzimas são liberadas em grandes quantidades na corrente sanguínea quando há dano à membrana de hepatócitos, resultando em aumento de sua permeabilidade (BABCOCK *et al.*, 1981). A causa mais comum de moderadas elevações destas enzimas é a esteatose, e a causa mais freqüente de esteatose é o abuso de álcool. Os resultados apontaram um aumento expressivo nos níveis plasmáticos de ambas as enzimas decorrente do tratamento com o álcool associado à dieta hipoprotéica. O aumento plasmático das transaminases ocorreu de forma paralela ao aumento nas taxas de lipoperoxidação, reforçando a possibilidade de dano de membranas de hepatócitos.

O processo de lipoperoxidação ocorre através da agressão das espécies reativas de oxigênio aos ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas, desencadeando mudanças na permeabilidade celular e alteração no fluxo iônico e de outras substâncias, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações no DNA, e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos,

colágeno e elastina) (LIMA & ABDALLA). Assim, o aumento da taxa de LPO provavelmente elevou a permeabilidade dos hepatócitos, permitindo o extravasamento das transaminases para a corrente sanguínea. Muitos trabalhos sugerem que a peroxidação lipídica é o principal mecanismo de indução de danos teciduais em diferentes tecidos (SAKAGUCHI *et al.*, 2011), incluindo o fígado, no qual funcionaria como iniciadora de processos fibróticos (REINKE, 2002). A metabolização do álcool é um dos principais processos responsáveis pela produção de radicais livres, portanto, os níveis de LPO conseqüentemente são superiores nos consumidores de álcool. A alteração observada nas taxas de lipoperoxidação foi apontada como sendo resultante da administração crônica de etanol associada à dieta reduzida em proteínas, contribuindo de forma efetiva na produção exacerbada de espécies reativas e conseqüentemente na agressão às membranas celulares.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um processo natural, uma vez que a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo (BARREIROS *et al.*, 2006), e uma variedade de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos estão envolvidos na proteção celular contra estas espécies (HALLIWELL, 1999). Porém, alguns destes mecanismos são modificados após longos períodos de exposição ao etanol. Um dos antioxidantes enzimáticos essenciais no processo de defesa do organismo frente às ERO é a enzima superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD), induzida consistentemente em animais experimentais após a administração aguda e crônica de etanol (KOCH, 2004). A ingestão crônica de etanol provoca um aumento na regulação de Mn-SOD em nível de RNAm, o que parece ser um mecanismo de proteção (KOCH, 2004; KOCH *et al.*, 1994.). Com a administração de repetida de etanol o aumento nos níveis de Mn-SOD é gradualmente diminuído. Assim, a resposta de adaptação da Mn-SOD é neutralizada, levando ao aumento da toxicidade com a exposição prolongada de etanol KOCH *et al.*, 1994).

No entanto, os efeitos da exposição crônica ao etanol nos conteúdos celulares ou na atividade da SOD são controversos, com relatos de aumento ou diminuição na atividade da enzima variando com o modelo utilizado, dieta, quantidade, e tempo de exposição ao etanol (WU & CEDERBAUM, 2009). Os resultados deste trabalho indicam uma diminuição nos níveis hepáticos da SOD nos animais do grupo tratado com dieta hipoproteica e álcool e um aumento nos que receberam etanol e dieta normoproteica quando comparados com seus respectivos grupos controles (água).

Esta alteração foi provocada pelo tipo de dieta (6% ou 23% de proteína), mas com os dados apresentados seu exato mecanismo não pode ser inferido.

A Cat é outra enzima antioxidante fundamental para a manutenção da homeostase celular frente à exposição ao etanol. A atividade da Cat foi diminuída no grupo tratado com uma dieta hipoproteica e etanol quando comparada ao grupo controle (água), o que pode ser explicado pela influência da enzima na oxidação do etanol, uma vez que esta é uma das vias de biotransformação do etanol (JORDÃO et al, 1998). Ambas as enzimas, SOD e Cat, apresentaram o mesmo perfil de variação diante do etanol e da dieta hipoprotéica, corroborando a interação entre estes dois fatores para o estabelecimento de doenças hepáticas alcoólicas.

As alterações celulares encontradas na histologia confirmaram o estabelecimento de esteatose hepática, caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos. A existência de pequenos acúmulos de lipídeos no grupo água-hipoproteico deve-se provavelmente à dieta, outro fator que possibilita o desenvolvimento da esteatose, porém a quantidade de micro e macroesteatose no grupo álcool-hipoproteico foi extremamente superior, evidenciando o papel desempenhado pelo etanol na doença, o qual atuou em conjunto com a dieta de baixa proteína e acentuou o acúmulo de lipídios em hepatócitos. Nos grupos tratados com dieta normoproteica não foram encontradas alterações histológicas, independentemente da dieta líquida correlacionada, corroborando mais uma vez a importância da interação entre dieta pobre em proteína e álcool no estabelecimento da EHA, e ressaltando o caráter 'protetor' das proteínas sobre o tecido hepático. Em concordância com este resultado, recentemente foi publicado que suplementação dietética com proteínas de soja parece melhorar o acúmulo de lipídeos induzido pelo etanol (YANG *et al.*, 2012). Embora o acúmulo de triglicerídeos ocorra tanto na esteatose quanto na esteatohepatite, características histológicas como lesão celular, infiltrados inflamatórios, morte celular (corpos apoptóticos), degeneração hidrópica e presença de miofibroblastos ocorrem predominantemente na esteatohepatite, distinguindo-a da condição de esteatose (WING-KIN SYN *et al*, 2009). Nossos dados não apontaram infiltrados inflamatórios significativos, portanto, apenas o estágio de esteatose foi detectado.

O acúmulo de lipídeos no fígado é decorrente de vários fatores, entre eles está a má alimentação, uma vez que o alcoolista é frequentemente um desnutrido crônico e há alteração nos processos metabólicos naturais pela biotransformação do etanol, o

qual resulta na produção excessiva de AcetilCoA e consequentemente síntese aumentada de ácidos graxos pelos hepatócitos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2012). A deficiência proteica causada pela má alimentação pode influenciar diretamente no acúmulo de gordura no fígado, uma vez que na inanição há falta tanto de aminoácidos como de colina, que é indispensável para a síntese de fosfolípidios. A colina pode ser sintetizada no organismo, porém isto exige uma reação de transmetilação envolvendo a metionina, que é um aminoácido essencial. Assim, há uma deficiência na produção de lipoproteínas VLDL, responsáveis pela exportação de triglicerídeo do fígado para outros tecidos, causando acúmulo deste nos hepatócitos (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2012).

Durante o metabolismo do etanol, o acúmulo de AcetilCoA gerado pela interrupção do ciclo de Krebs é desviado para a síntese de ácidos graxos, uma vez que grande parte do NAD^+ que seria utilizado como aceptor de elétrons no ciclo é consumido durante a metabolização do etanol, formando NADH, não havendo coenzima disponível para quebra de AcetilCoA para a formação de CO_2 e água (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2012).

Portanto, vários mecanismos operam de uma maneira sincronizada para o estabelecimento da esteatose hepática alcoólica. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, ficou evidente que o etanol foi capaz de induzir estresse oxidativo e acúmulo hepático de lipídios em camundongos, estabelecendo a EHA. Em concordância com o estabelecimento desta enfermidade, observou-se aumento nos níveis plasmáticos de ALT e AST, nos níveis hepáticos de LPO, além de diminuição considerável na atividade das enzimas Cat e SOD, tendo seus efeitos acentuados quando combinado diretamente com uma dieta hipoproteica.

6 CONCLUSÕES

As diferenças obtidas nas análises de bioquímica plasmática, de estresse oxidativo e na histologia hepática corroboram a interação positiva entre uma dieta deficiente em proteínas e o etanol no desenvolvimento da esteatose hepática alcoólica, tendo também o estresse oxidativo um importante papel na patogênese desta doença.

Com isso, um modelo *in vivo* de esteatose hepática alcoólica pôde ser implantado com sucesso, permitindo que estudos futuros sejam desenvolvidos, especialmente com a finalidade de investigar os mecanismos fisiopatológicos desta enfermidade e de estabelecer possíveis alvos terapêuticos aplicáveis ao tratamento da EHA.

REFERÊNCIAS

ADAMS, L.A. *et al.* **The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies.** J Hepatol, 42(1):132-8, 2005.

AEBI, H. **Catalase in vitro.** Methods Enzymol, 105:121-6, 1984.

ARTEEL, G.E. **Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease.** Gastroenterol, 124(3):778-90, 2003.

ARTEEL, G. *et al.* **Advances in alcoholic liver disease.** Best Pract Res Clin Gastroenterol, 17(4):625-47, 2003.

BABCOCK, J.L. *et al.* **Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*).** Toxicon, 19:463-471, 1981.

BARREIROS A. *et al.* **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Quím Nov, v.29, n.1, São Paulo, 2006.

BERR C. *et al.* **Alcohol health effects.** Expertise Collective, France, 2001.

BRADFORD M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.** Anal Biochem, 72: 248–254, 1976.

BREITKOPF, K. *et al.* **Current experimental perspectives on the clinical progression of alcoholic liver disease.** Alcohol Clin Exp Res, 33(10):1647-55, 2009.

BRUNT, E.M. **Pathology of fatty liver disease.** Mod Pathol, 20 Suppl 1:S40-S48, 2007.

CAIRNS, S.R. & PETERS, T.J. **Biochemical analysis of hepatic lipid in alcoholic and diabetic and control subjects.** Clin Sci (Lond), 65(6):645-52, 1983.

CARLINI E.A. *et al.* **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país – 2005.** Supervisão E.A.Carlini; Coordenação J.C.F. Galduróz; Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

CZAJA, M.J. **Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury.** *Semin Liver Dis*, 27(4):378-89, 2007.

CEDERBAUM, A.I. **Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury.** *Free Radic Biol Med*,15;31(12):1524-6 2001.

DEY, A. & CEDERBAUM, A.I. **Alcohol and oxidative liver injury.** *Hepatology*, 43(2 Suppl 1):S63-S74, 2006.

DICHI, J.B. *et al.* **Conseqüências nutricionais da dietoterapia restrita em sódio (50 mEq) em pacientes cirróticos com ascite.** *Rev Bras Nutr Clin*, 8:11, 1993.

FERREIRA A. & MATSUBARA L. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo.** *Rev Assoc Med Bras*, v.43, n.1, São Paulo, 1997.

FRENCH, S.W. **Biochemical basis for alcohol-induced liver injury.** *Clin Biochem*, 22(1):41-9, 1989.

FRIDOVICH, I. **Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters.** *J Biol Chem*, 25, 272(30):18515-7, 1997.

GLÓRIA, L. *et al.* **Nutritional deficiencies in chronic alcoholics: relation to dietary intake and alcohol consumption.** *Am J Gastroenterol*, 92:485, 1997.

GONÇALVES, C. S. & PEREIRA, F. E. L. **Hepatopatia Alcoólica: Patogênese e Tratamento.** Programa de Educação Médica Continuada da Sociedade Brasileira de Hepatologia, fascículo 7, p. 3-7, 200_.

HALLIWELL, B. **Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)**. *Free Radic Res*, 31(4):261-72, 1999.

HASHIMOTO, T. *et al.* **Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting**. *J Biol Chem*, 15;275(37):28918-28, 2000.

HENZEL K. *et al.* **Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644:37– 45, 2004.

HU S. *et al.* **Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis**. *Euro J of Pharmacol*, 616(1-3): 287-292, 2009.

JIANG Y, WOOLLARD ACS, WOLFF SP. **Lipid Hydroperoxide measurement by oxidation of Fe+2 in the presence of xilenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method**. *Lipids*, 26: 853-856, 1991.

JORDÃO, Jr. A.A. *et al.* **Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamna E**. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31:434-449, 1998.

KOCH, O.R. GPSBRCACSFTG. **Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury**. *Molec Asp of Med*, 25:191-8, 2004.

KOCH, O.R. *et al.* **Ethanol treatment up-regulates the expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase in rat liver**. *Biochem Biophys Res Commun*, 30, 201(3):1356-65, 1994.

KOROURIAN, S. *et al.* **Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats**. *Toxicol Sci*, 47(1):110-7, 1999.

KUKIELKA, E. *et al.* **Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment.** Arch Biochem Biophys, 309(2):377-86, 1994.

LEFKOWITC, J.H. **Morphology of alcoholic liver disease.** Clin Liver Dis, 9(1):37-53, 2005.

LIEBER, C.S. **Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis.** Alcohol, 34(1):9-19, 2004.

LIMA, E. S. & ABDALLA D. S. P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Braz J of Pharmaceutical Sciences, vol. 37, n. 3, 2001.

LISTENBERGER, L.L. *et al.* **Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.** Proc Natl Acad Sci U S A, 100(6):3077-82, 2003.

LOCKWOOD, D.H. *et al.* **Effect of oral amino acid supplementation on liver disease after jejunoileal bypass for morbid obesity.** Am J Clin Nutr, 30(1):58-63, 1977.

LUKIVSKAYA, O. *et al.* **Antioxidant mechanism of hepatoprotection by ursodeoxycholic acid in experimental alcoholic steatohepatitis.** Adv Med Sci. 51, 54-59, 2006.

MAIO, R. *et al.* **The impact of alcohol and chronic liver disease of micronutrients metabolism.** Arq Gastroenterol, 37(2):120-124, 2000.

MANTLE, D. & PREEDY, V.R. **Free radicals as mediators of alcohol toxicity.** Adverse Drug React Toxicol Rev, 18(4):235-52, 1999.

MEGHELLI-BOUCHENAK, M. *et al.* **Hepatic steatosis and serum very low density lipoproteins during two types of protein malnutrition followed by balanced refeeding.** *Nutrition*, 5(5):321-9, 1989.

NATH, B. & SZABO, G. **Alcohol-induced modulation of signaling pathways in liver parenchymal and nonparenchymal cells: implications for immunity.** *Semin Liver Dis*, 29(2):166-77, 2009.

NORDMANN, R. *et al.* **Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury.** *Free Radic Biol Med*, 12(3):219-40, 1992.

ORLICKY, D. J. *et al.* **Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties.** *Alcohol Clin Exp Res*, 35(6):1020-33, 2011.

REDDY, J.K. & HASHIMOTO, T. **Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system.** *Annu Rev Nutr*, 21:193-230, 2001.

REIS J. *et al.* **Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1.** *Arq Bras de Endocrinologia & Metabologia*, v.52, n.7, São Paulo, Outubro 2008.

REINKE, L. A. **Spin trapping evidence for alcohol associated oxidative stress.** *Free Radic. Biol. Med*, 32, 953-957, 2002.

ROSS, L.J. *et al.* **Prevalence of malnutrition and nutritional risk factors in patients undergoing alcohol and drug treatment.** *Nutrition*, 2012.

SAKAGUCHI, S. *et al.* **Progression of alcoholic and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress.** *Drug Metab. Pharmacokinet.* 26(1), 30-46, 2011.

SANYAL, A.J. **AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease.** *Gastroenterology*, 123(5):1705-25, 2002.

SARIN, S.K. *et al.* **Dietary and nutritional abnormalities in alcoholic liver disease: a comparison with chronic alcoholics without liver disease.** Am J Gastroenterol, 92:777-83, 1997.

SILVA, V.A. & MCLEAM, A.E.M. **Effect of two different types of malnutrition on the rate of elimination of ethanol in rats.** Biochem Pharmacol. 37, 4235-8, 1988.

SILVEIRA, D.X. & MOREIRA, F.G. **Panorama atual de drogas e dependências.** Atheneu, 2006.

SOZIO, M. & CRABB, D.W. **Alcohol and lipid metabolism.** Am J Physiol Endocrinol Metab, 295(1):E10-E16, 2008.

TSUKAMOTO, H. & LU, S.C. **Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury.** FASEB J, 15(8):1335-49, 2001.

UNGER, R.H. **Lipotoxic diseases.** Annu Rev Med, 53:319-36, 2002.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (São Paulo). Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Anatomia Patológica. **Esteatose Hepática.** Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/taesteatose.html>>. Acesso em: 10 junho 2012.

WEBSTER, A.J. **Energy partitioning, tissue growth and appetite control.** Proc. nutr. soc., 52 (1): 69-76, 1993.

WHEELER, M.D. & THURMAN, R.G. **Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway.** J Biol Chem, 7;278(10):8435-41, 2003.

WING–KIN SYN, M.B.Ch.B. *et al.* **Similarities and differences in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis.** *Semin Liver Dis*, 29(2): 200-210, 2009.

WILLIAMS, R. **Global challenges in liver disease.** *Hepatology*, 44(3):521-6, 2006.

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO). **The World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life.** WHO. Geneva, 2002.

WU, D. & CEDERBAUM, A.I. **Oxidative stress and alcoholic liver disease.** *Semin Liver Dis*, 29(2):141-54, 2009.

YAMASHINA, S. *et al.* **Ethanolinduced sensitization to endotoxin in Kupffer cells is dependent upon oxidative stress.** *Alcohol Clin Exp Res*, 29(12 Suppl):246S-50S, 2005.

YANG, H.Y. *et al.* **Effects of soy protein on alcoholic liver disease in rats undergoing ethanol withdrawal.** *J Nutr Biochem*, 2011.