

Perfil em ácidos graxos hepáticos de ratos com esteatose induzida pela dieta AIN-93 atenuada pela substituição parcial do óleo de soja por dieptanoína e trieptanoína

Hepatic fatty acid profile of rats with AIN-93 diet-induced steatosis attenuated by the partial substitution of soybean oil by dieptanoin and trieptanoin

Nassib Bezerra Bueno¹, Maria Adriana Firmino da Silva¹, Ingrid Sofia Vieira de Melo¹, Terezinha da Rocha Ataíde¹, Suzana Lima de Oliveira¹, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana²

¹ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, AL, Brasil
² Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL, Maceió, AL, Brasil

Em estudos anteriores foram relatadas as repercussões metabólicas hepáticas do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína, di e triacilgliceróis homogêneos do ácido enântico (heptanoico; 7:0), discutidas no trabalho de Silva e cols. (1) e, posteriormente, no estudo de Ataíde e cols. (2), que mostraram que esses acilgliceróis exercem um potencial efeito hepatoprotetor contra a esteatose, numa feição dose-dependente. O perfil em ácidos graxos (AG) de lipídios dietéticos determina a incorporação e a composição em AG das membranas biológicas, alterando diversas funções celulares (3), principalmente pela modulação dos AG esterificados aos fosfolipídios de membrana (4). Dessa forma, investigar a repercussão do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína sobre a modulação do perfil em AG dos lipídios hepáticos de ratos e se tal modulação guarda alguma relação com a esteatose apresentada pelos animais reveste-se de particular importância.

Naquele estudo (1), os ratos foram alocados em quatro grupos, nomeados conforme a dieta a que haviam sido submetidos: grupo TAGC₇0, dieta padrão AIN-93 (5), cuja fonte lipídica é o óleo de soja; grupo TAGC₇30, dieta com 30% de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental (64% trieptanoína, 34% dieptanoína, 2% monoepitanoína); grupo TAGC₇50, dieta com 50% de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental; e, grupo controle, com ração para roedores Labina[®]. Até os dois meses de idade, os animais dos grupos TAGC₇0, TAGC₇30 e TAGC₇50 receberam a versão G (*growth*) da dieta AIN-93; a partir daí até o final do experimento, a versão M (*maintenance*).

Os animais dos grupos TAGC₇0, TAGC₇30 e TAGC₇50, cujos teores lipídicos hepáticos totais foram significativamente superiores aos do grupo controle, apresentaram quadro de esteatose hepática (EH), discutido nos trabalhos de Silva e cols. (1) e Ataíde e cols. (2). O grupo TAGC₇0 apresentou o dobro (80%) do número de casos graves, graus 4 e 5, quando comparado ao grupo TAGC₇50 (40%), conforme estadiamento da EH em ratos, estabelecido naqueles trabalhos. Os animais do grupo controle não apresentaram EH. Tal achado histológico levou o grupo de pesquisadores a desenvolver o presente estudo, visando determinar se a substituição do óleo da dieta pelo óleo experimental induziu diferenças importantes no perfil em AG dos lipídios hepáticos e se tal perfil guardou relação com a infiltração gordurosa encontrada.

Correspondência para:
Nassib Bezerra Bueno
Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Campus A. C. Simões, Cidade Universitária, BR 104 Norte, Km 97 57072-970 – Tabuleiro dos Martins, Maceió, Brasil
nassibbb@hotmail.com

Recebido em 12/Fev/2010
Aceito em 25/Maio/2010

Para a presente proposta, procedeu-se à extração por solventes orgânicos e à determinação dos lipídios totais dos fígados dos ratos oriundos daqueles trabalhos (1,2), seguidas por saponificação, conforme Gilani e cols. (6). Aos extratos lipídicos, adicionou-se solução de KOH 0,1 M, e a mistura reacional foi mantida sob refluxo, por 2 horas. O material saponificado resultante foi acidificado com HCl 0,1 M para obtenção dos AG livres, que foram recuperados com clorofórmio e submetidos à metilação com BF₃ em metanol (14%), à temperatura ambiente, por 72 horas. O produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando-se clorofórmio como eluente, para obtenção dos ésteres metílicos de AG.

O perfil em AG do tecido hepático dos animais foi determinado por cromatografia gasosa de alta resolução dos ésteres metílicos, utilizando-se um cromatógrafo a gás (HP 5890), equipado com uma coluna capilar SP-2560 (Supelco; 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm), acoplado a um detector de ionização de chama. A programação de temperatura foi 130°C (1 min) a 170°C (6,5°C/min), 170°C a 215°C (2,75°C/min), 215°C (12 min), 215°C a 230°C (4°C/min) e 230°C (3 min). As temperaturas do injetor e detector foram de 270°C e 280°C, respectivamente. As amostras (0,3 µl) foram injetadas pela técnica de injeção direta. Os AG foram identificados por comparação com cromatograma de padrões de AG metilados e eluídos nas mesmas condições. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, tendo sido aprovado sob o número 001316/2002-30.

Os resultados foram avaliados segundo os pressupostos paramétricos de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Levene). Para os AG que apresentaram resíduos com uma distribuição normal padronizada e homocedásticos, realizou-se análise de variância (ANOVA; $p < 0,05$) e suas médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Tukey-HSD ($p < 0,05$). Para os demais AG, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (teste χ^2 ; $p < 0,05$) e suas médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Nemenyi ($p < 0,05$). Adicionalmente, foi realizado teste de correlação linear de Spearman entre graus de EH e concentração hepática de AG palmítico e linoleico ($p < 0,05$).

Diferente dos ácidos heptadecanoico, γ -linolênico, docosa-hexaenoico, mirístico, pentadecanoico, esteárico e α -linolênico, as concentrações hepáticas dos ácidos palmítico, palmitoleico, oleico, linoleico e 11,14,17-

eicosatrienoico diferiram significativamente entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios percentuais de ácidos graxos do tecido hepático dos ratos dos grupos TAGC₀, TAGC₃₀, TAGC₅₀ e controle

| Ácidos graxos (%; escores médios) | Grupos | | | |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | TAGC ₀ | TAGC ₃₀ | TAGC ₅₀ | Controle |
| Mirístico ² | 0,6829 ^a | 0,2977 ^a | 0,4414 ^a | 0,0000 ^b |
| Pentadecanoico ² | 0,0819 ^a | 0,0420 ^a | 0,0947 ^a | 0,0000 ^b |
| Palmitico ² | 21,4709 ^a | 7,3253 ^c | 13,5460 ^b | 5,6234 ^c |
| Palmitoleico ² | 6,1375 ^a | 3,2753 ^b | 3,0949 ^b | 0,0871 ^c |
| Heptadecanoico ¹ | 0,1146 ^a | 0,0413 ^a | 0,0921 ^a | 0,1297 ^a |
| Esteárico ² | 2,4950 ^a | 0,8597 ^a | 2,9555 ^a | 3,8530 ^a |
| Oleico ² | 18,4260 ^a | 3,1110 ^c | 10,3263 ^b | 1,9491 ^c |
| Linoleico ² | 10,8767 ^a | 3,9563 ^b | 5,4381 ^b | 2,3593 ^b |
| γ -Linoleico ¹ | 0,3453 ^a | 0,1530 ^a | 0,2251 ^a | 0,1886 ^a |
| α -Linolênico ² | 0,3970 ^a | 0,1147 ^a | 0,1906 ^a | 0,0000 ^b |
| 11,14,17-eicosatrienoico ² | 4,5680 ^a | 1,3430 ^b | 4,4244 ^a | 1,9821 ^b |
| Docosaexaenoico ¹ | 1,5606 ^a | 0,0800 ^a | 1,0457 ^a | 0,1530 ^a |

¹ Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste *post-hoc* de Tukey-HSD ($p < 0,05$).

² Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste *post-hoc* de Nemenyi ($p < 0,05$).

Os fígados dos animais que receberam o óleo experimental, grupos TAGC₃₀ e TAGC₅₀, apresentaram níveis significativamente menores de palmitato e oleato do que aqueles do grupo TAGC₀ ($p < 0,05$). Curiosamente, o grupo TAGC₅₀ apresentou concentrações mais elevadas desses AG do que o grupo TAGC₃₀ ($p < 0,05$). Com relação ao ácido palmitoleico, os ratos alimentados com o óleo experimental apresentaram valores significativamente menores que aqueles alimentados com dieta sem substituição do óleo de soja, grupo TAGC₀, e valores significativamente maiores que aqueles do grupo controle ($p < 0,05$). Foram observados níveis significativamente maiores de ácido linoleico no grupo TAGC₀, em relação aos demais ($p < 0,05$). O ácido 11,14,17-eicosatrienoico, por sua vez, não pareceu obedecer a um padrão, pois os grupos TAGC₀ e TAGC₅₀ foram semelhantes entre si, a exemplo do que ocorreu entre os grupos TAGC₃₀ e controle (Tabela 1). O perfil em AG das dietas ofertadas aos animais, com aproximadamente 4% de lipídios totais, encontra-se na tabela 2.

Quanto à repercussão do perfil em AG das dietas sobre o perfil em AG do fígado dos animais, as concentrações hepáticas dos ácidos palmítico, oleico e 11,14,17-eicosatrienoico poderiam resultar de mecanismos contraditórios associados ao consumo de AG de

Tabela 2. Valores percentuais aproximados dos ácidos graxos mais abundantes nas dietas oferecidas aos animais dos grupos TAGC₀, TAGC₃₀, TAGC₅₀ e controle

| Ácidos graxos (%) | DIETAS | | | |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | TAGC ₀ | TAGC ₃₀ | TAGC ₅₀ | Controle |
| Enântico | ND | 30,00 | 50,00 | ND |
| Palmitico | 9,46 | 5,49 | 2,65 | 24,18 |
| Esteárico | 3,88 | 1,84 | 1,05 | 4,41 |
| Oleico | 15,46 | 8,74 | 5,35 | 32,33 |
| Linoleico | 42,31 | 17,97 | 13,86 | 39,21 |
| Linolênico | 5,98 | 2,78 | 2,08 | ND |

ND: não detectado.

cadeia média, tais como redução do *pool* de AG hepáticos, pela rápida β -oxidação, com liberação de energia (efeito termogênico), e síntese *de novo* e/ou alongação e dessaturação de lipídios hepáticos, pela formação excessiva de grupos acetila liberados pela β -oxidação, conforme discutido por Lucena e cols. (7). A resultante desses mecanismos, no presente trabalho, provavelmente sofreu influência das diferentes concentrações de ácido enântico nas dietas experimentais.

O menor consumo de AG de cadeia longa, por sua vez, de maneira geral, parece ter contribuído para a menor concentração desses AG no fígado dos animais submetidos à substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental. Tais considerações auxiliam o entendimento da relação entre composição em AG da dieta e o quadro de EH, cuja gravidade foi particularmente mais elevada no grupo de animais do grupo TAGC₀, que recebeu dieta sem adição de ácido enântico. No entanto, questões outras relacionadas à composição da dieta AIN-93, a exemplo do teor de fatores lipotróficos, devem ter exercido papel relevante na indução do quadro de EH, como apontado por Silva e cols. (1), uma vez que os animais do grupo controle não apresentaram EH, apesar do consumo de fontes alimentares de AG de cadeia longa.

No que diz respeito à associação entre o perfil em AG hepáticos e o quadro de EH, podem ser destacados os ácidos palmítico e linoleico, não apenas pelas concentrações observadas, mas, especialmente, por alguns de seus efeitos metabólicos, que guardam uma possível relação com a infiltração gordurosa. Na presente investigação, foi encontrada correlação linear positiva significativa entre a concentração de ácido palmítico e graus de EH ($r_{\text{Spearman}} = 0,52$; $p < 0,01$). No entanto, o mesmo não foi observado para o ácido linoleico ($r_{\text{Spearman}} = 0,34$; $p \geq 0,05$).

Um dos fatores que parece contribuir de maneira importante para a patogênese e a progressão da esteatose é a disfunção mitocondrial hepática (8), que, por sua vez, parece ter como causa principal a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e de aldeídos reativos, que causam dano mitocondrial, gerando um círculo vicioso (9). O estudo de Li e cols. (10) mostrou que o palmitato é um potente indutor da geração de espécies reativas de oxigênio mitocondriais. Ademais, este ácido graxo induz apoptose de hepatócitos (11), que é uma manifestação evidente e um preditor independente de esteato-hepatite não alcoólica (12). Portanto, a quantidade significativamente maior de palmitato encontrada no grupo TAGC₀ e a correlação linear positiva significativa entre a concentração hepática desse ácido graxo e os graus de EH observados nos animais dos diferentes grupos são fatores potencialmente deletérios no que diz respeito ao prognóstico da doença.

A concentração significativamente maior de linoleato no grupo TAGC₀, por sua vez, pode ser explicada pelo maior consumo de óleo de soja, quando comparado aos grupos TAGC₃₀ e TAGC₅₀. AG poliinsaturados da família ω -6 e ω -3, de 18 a 22 átomos de carbono, ativam mais fortemente todas as isoformas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) que os AG saturados e monoinsaturados. Adicionalmente, são mais potentes ativadores da oxidação e supressores da síntese de AG e, portanto, da síntese de triacilgliceróis que aqueles últimos (13), o que promoveria um efeito hepatoprotetor contra a esteatose. No entanto, os potenciais efeitos danosos do acúmulo de linoleato, por ser um ácido graxo poliinsaturado e, portanto, mais suscetível à peroxidação lipídica, parecem ter suprimido uma possível ação benéfica.

Com o intuito de investigar a segurança e a tolerabilidade do consumo de ésteres de glicerol com ácido heptanoico, Lucena e cols. (7) realizaram uma avaliação toxicológica do consumo de triptanoína, em proporções cetogênicas, em ratos. Os autores concluíram que, apesar do quadro de EH observado, de características mais brandas que aquelas encontradas no presente estudo, a dieta cetogênica rica em triptanoína não promoveu efeitos metabólicos adversos nos animais. Desdobramentos de tal trabalho, a exemplo da determinação do perfil em AG do tecido hepático, atualmente em curso, poderão auxiliar na elucidação da repercussão do consumo de triptanoína, no contexto da EH, dada a maior concentração de lipídios dietéticos.

Agradecimentos: Agradecemos aos professores Severino Matias de Alencar (ESALQ-USP), Edma Carvalho de Miranda e Denise Maria Pinheiro (IQB-UFAL) pelas análises cromatográficas; ao professor Cyro Rego Cabral Jr. (FANUT-UFAL) pelo auxílio na análise estatística; e à Fernanda Galdino de Oliveira e Mércia Cruz Santos pelo apoio na execução do trabalho.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Silva MAF, Ataíde TR, Oliveira SL, Sant'Ana AEG, Cabral Jr CR, Balwani MC, et al. Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52:1145-55.
2. Ataíde TR, Oliveira SL, Silva FM, Vitorino-Filha LG, Tavares MC, Sant'Ana AEG. Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. *Int J Food Sci and Technol.* 2009;44:484-92.
3. Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev.* 2005;80:155-69.
4. Pan DA, Storlien LH. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr.* 1993;123(3):512-9.
5. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 a diet. *J Nutr.* 1997;127:838-41.
6. Gilani GS, Ratnayake WM, Brooks SP, Botting HG, Plouffe LJ, Lampi BJ. Effects of dietary protein and fat on cholesterol and fat metabolism in rats. *Nutr Res.* 2002;22:297-311.
7. Lucena ALM, Oliveira SL, Ataíde TR, Silva AX, Cabral Jr. CR, Oliveira MAR, et al. High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010;112(2):166-72.
8. Oliveira CPMS, Coelho AMM, Barbeiro HV, Lima VMR, Soriano F, Ribeiro C, et al. Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(2):189-94.
9. Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion.* 2006;6:1-28.
10. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology.* 2008;47(5):1495-503.
11. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2008;19:567-76.
12. Wieckowska A, Zein NN, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2006;44:27-33.
13. Clarke SD, Thuillier P, Baillie RA, Sha X. Peroxisome proliferator-activated receptors: family lipid-activated transcription factors. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:566-71.