

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

***REPERCUSSÃO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA TERMOLIZADA EM  
PARÂMETROS MORFO-FUNCIONAIS DO TECIDO HEPÁTICO***

**ELISA BATISTA OLIVEIRA E SILVA**

**MACEIÓ-AL  
2012**

**ELISA BATISTA OLIVEIRA E SILVA**

***REPERCUSSÃO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA TERMOLIZADA EM  
PARÂMETROS MORFO-FUNCIONAIS DO TECIDO HEPÁTICO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: **Prof.<sup>a</sup> Dra. Suzana Lima de Oliveira**  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientadora: **Prof.<sup>a</sup> Dra. Terezinha da Rocha Ataíde**  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

**MACEIÓ-AL**

**2012**

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

**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

S586r Silva, Elisa Batista Oliveira e.  
Repercussão da ingestão crônica de dieta termolizada em parâmetros morfo-  
funcionais do tecido hepático / Elisa Batista Oliveira e Silva. – 2012.  
55 f. : il., color.

Orientadora: Suzana Lima de Oliveira.

Co-orientadora: Terezinha da Rocha Ataíde.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de  
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 48-52

Anexos: f. 53-55.

1. Glicação. 2. Dieta termolizada. 3. Fígado. 4. Tiamina. 5. Metabolismo  
hepático. I. Título.

CDU: 612.396:612.35



**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: 81 3214-1160

---

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO**

**“REPERCUSSÃO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA  
TERMOLIZADA EM PARÂMETROS MORFO-  
FUNCIONAIS DO TECIDO HEPÁTICO”**

por

***Elisa Batista Oliveira e Silva***

A Banca Examinadora, reunida aos 13 dias do mês de março do ano de 2012, considera a candidata **APROVADA**.

---

Prof.ª. Dra. Suzana Lima de Oliveira  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador)

---

Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho  
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas/UNCISAL  
(Examinador)

## DEDICATÓRIA

Eu dedico a Deus, pois na sua infinita misericórdia concedeu-me mais esta vitória para que eu possa aplicar o aprendizado recebido na minha vida pessoal e profissional, sempre buscando e inovando na ciência da Nutrição, difundindo o conhecimento aos que dele sentem sede.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva concebida de viver e saborear os frutos das vitórias alcançadas.

A meus pais, Sineide e José Oliveira, por terem me dado o alicerce necessário para eu me tornar uma pessoa e uma profissional de valores éticos que levarei sempre comigo.

À minha avó, Edília, ao meu irmão, Elisson, e ao meu namorado, Bruno, pelo carinho e apoio a mim dedicados.

À minha orientadora, Suzana, pelo exemplo de profissionalismo, pelo incentivo à pesquisa e à docência, dando o suporte necessário ao mergulho aprofundado nas águas da ciência. Sua notável presença eu quero levar comigo mesmo que, ocasionalmente, eu siga em caminhos distantes.

À minha co-orientadora, Terezinha, pelos ensinamentos adquiridos na área da docência e pelo suporte ofertado sempre que necessário fosse. Gosto de tê-la sempre como exemplo a seguir e quero que a amizade formada através da Nutrição seja duradoura.

À prof.<sup>a</sup> Luci, pelo incentivo à pesquisa sobre a temática da glicação, dando um forte exemplo de sempre caminhar e reunir esforços pelo que se acredita. Suas sementes plantadas germinaram e agora crescem, deixando sua presença infinita.

Ao prof. Cyro, pelo apoio durante as análises estatísticas.

À Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo, pelo apoio durante as análises histológicas.

À minha amiga, Rose Carolinne, e à equipe do projeto AGE, pelo companheirismo presente durante toda esta caminhada.

À minha amiga, Tâmara, pelo apoio disponibilizado sempre e principalmente na etapa de eutanásia dos animais.

À Elenita, técnica do Laboratório de Nutrição Experimental, pelo apoio dado durante a execução do projeto AGE.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, pelo necessário incentivo à pesquisa na forma de bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, o meu muito obrigada.

## RESUMO

AGEs, do inglês *Advanced Glycation End Products*, são compostos heterogêneos com propriedades pró-oxidantes e pró-inflamatórias. Estes compostos são formados no organismo (especialmente em condições de hiperglicemia e estresse oxidativo) e no ambiente, sendo a dieta sua principal fonte exógena. Alimentos neutros ou alcalinos, submetidos a tratamento térmico com temperaturas superiores a 100°C com baixa umidade, por tempo prolongado, apresentam formação aumentada de AGEs, condições encontradas com frequência na dieta típica do ocidente, que constitui fonte de alto teor de AGEs. O tratamento térmico dos alimentos, além de formar AGEs, contribui para a redução da vitamina termolábil com ação antiglicante e essencial para seres humanos, tiamina. O consumo crônico de dieta rica em AGEs e deficiente em tiamina são condições que favorecem o estresse oxidativo, o estresse carbonílico e a inflamação persistentes, contribuindo para o processo de envelhecimento junto ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas. Quando absorvidos, os AGEs dietéticos somam-se aos produzidos no organismo aumentando seu *pool* corporal, passando pelos rins e pelo fígado, sofrem catabolismo e degradação para serem eliminados. Particularmente, o fígado é o principal órgão de *clearance* e catabolismo de AGEs, tornando-se um alvo fácil para os efeitos prejudiciais dos AGEs. Em situações de deficiência de tiamina, o hepatócito fica mais susceptível ao glioxal, uma carbonila altamente reativa, precursora dos AGEs, e aos próprios AGEs, com conseqüente prejuízo do metabolismo do glioxal no fígado. A suplementação de tiamina resulta em citoproteção, restauração da detoxificação do glioxal, redução da peroxidação lipídica e da formação de espécies reativas de oxigênio. Esses elementos motivaram a investigação dos efeitos do consumo crônico de dieta *termolizada*, modelo de experimental de elevada ingestão de AGEs, associado a diferentes níveis de tiamina, em aspectos morfo-funcionais do tecido hepático em ratos adultos. Para tanto, ratos machos *Wistar*, de cinco meses de idade, foram subdivididos em quatro grupos experimentais, segundo as dietas oferecidas: dieta comercial padrão, controle (C); *termolizada* (T), dieta padrão autoclavada a 121,5°C, por 30 min; *termolizada* com tiamina nível 1 (TT<sub>1</sub>), 6 mg de tiamina/Kg de dieta; e *termolizada* com tiamina nível 2 (TT<sub>2</sub>), 120 mg de tiamina/Kg de dieta. Após 23 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados e se procedeu à coleta de amostras de fígado e de sangue, para análise histológica do tecido hepático e determinações bioquímicas séricas de função e lesão hepática. O consumo crônico de dieta *termolizada* não promoveu o aparecimento de alterações morfo-funcionais sanguíneas e hepáticas em ratos adultos. É possível considerar que a composição da dieta de base utilizada no experimento pode ter contribuído para os resultados obtidos. O presente estudo chama a atenção para a importância da realização de estudos que esclareçam a participação dos diferentes componentes alimentares para a formação de AGEs em alimentos, o que contribuiria para o estabelecimento de recomendações dirigidas para a promoção de uma alimentação saudável, concorrendo para a prevenção de doenças crônicas, incluindo as que acometem o tecido hepático.

**Palavras-chave:** Glicação. Dieta. Fígado. Tiamina.

## ABSTRACT

AGEs, Advanced Glycation End Products, are heterogeneous compounds with pro-oxidant and pro-inflammatory properties. These compounds are formed in the body (particularly under conditions of hyperglycemia and oxidative stress) and in environment, being the diet their main source exogenous. Neutral or alkaline food, subjected heat-treated at temperatures above 100°C with low humidity, for prolonged periods had increased formation of AGEs, conditions frequently encountered in the typical Western diet, which is a source of high levels of AGEs. The heat treatment of food, in addition to form AGEs, contributes to reducing labile vitamin with anti-glycation action and essential for humans, thiamin. The chronic consumption of diet rich in AGEs and deficient in thiamin are conditions that promote oxidative stress, carbonyl stress and persisted inflammation, contributing to the aging process with the development of several chronic diseases. When absorbed, dietary AGEs are added to those produced in the body increasing your body pool, through the kidney and liver, undergo catabolism and degradation to be eliminated. In particular, the liver is the main organ of clearance and catabolism of AGEs, becoming an easy target for the damaging effects of AGEs. In cases of thiamin deficiency, the hepatocyte is more susceptible to glyoxal, a carbonyl highly reactive precursor of AGEs, and AGEs themselves, with consequent loss of glyoxal metabolism in the liver. Supplementation of thiamin results in cytoprotection, restoration of the glyoxal detoxification, reduction of lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species. These elements led to the investigation of the effects of chronic consumption of thermolyzed diet, experimental model of high intake of AGEs, associated with different levels of thiamin in morpho-functional aspects of liver tissue in adult rats. For this purpose, male Wistar rats, five months old, were divided into four experimental groups according to the offered diets: standard commercial diet, control (C); thermolyzed (T), standard diet autoclaved at 121.5°C for 30 min; thermolyzed with level 1 thiamin (TT<sub>1</sub>), thiamin 6 mg/kg of diet; and thermolyzed with level 2 thiamin (TT<sub>2</sub>), 120 mg thiamin/kg of diet. After 23 weeks of treatment, animals were anesthetized and proceeded to collect samples of liver and blood, to histological analysis of hepatic tissue and tests serum biochemical of hepatic function and injury. The chronic consumption of thermolyzed diet did not promote the appearance of morphological and functional alterations in adult rat blood and liver. It is possible to consider the composition of base diet used in the experiment may have contributed to the results obtained. This study draws attention to the importance of studies to clarify the involvement of different components food for the formation of AGEs in food, which contribute to the establishment of recommendations for promoting a healthy diet, contributing to the prevention chronic diseases, including those affecting the hepatic tissue.

**Key words:** Glycation. Diet. Liver. Thiamin.

## LISTA DE FIGURAS

Página

### Capítulo de revisão

- Figura 1 Localização do receptor *scavenger* para AGE e do RAGE no fígado..... 23

### Artigo de resultados

- Figura 2 Padrão histológico representativo do fígado dos ratos dos grupos de dieta Controle (C), *Termolizada* (T), *Termolizada* suplementada com tiamina nível 1 (6mg/kg de dieta, TT<sub>1</sub>) e *Termolizada* suplementada com tiamina nível 2 (120mg/kg de dieta, TT<sub>2</sub>)..... 39

## LISTA DE TABELAS

### Artigo de resultados

Tabela 1	Peso e Coeficiente de Eficiência Alimentar dos grupos experimentais submetidos às dietas controle (C), <i>termolizada</i> (T), <i>termolizada</i> acrescida de níveis fisiológicos de tiamina (TT1) e <i>termolizada</i> acrescida de níveis suplementares de tiamina (TT2), após 23 semanas de período experimental.....	37
Tabela 2	Análises séricas de ratos submetidos à dieta controle <i>termolizada</i> , <i>termolizada</i> acrescida de níveis fisiológicos de tiamina e <i>termolizada</i> acrescida de níveis suplementares de tiamina, após 23 semanas de período experimental.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AGE-BSA** – Albumina sérica bovina ligada a produtos de glicação avançada

**AGEs** – Produtos de glicação avançada, do inglês *Advanced Glycation End*

*Products*

**AIN(93)G** – Dieta para roedores em fase de crescimento

**ALT** – Alanina aminotransferase

**AST** – Aspartato aminotransferase

**C** – Controle

**CEA** – Coeficiente de eficiência alimentar

**CML** – Carboximetil lisina

**ELISA** – Ensaio de imuno absorbância ligado à enzima

**esRAGE** – RAGE solúvel de secreção endógena

**FA** – Fosfatase alcalina

**FANUT** – Faculdade de Nutrição

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**HE** – Hematoxilina-eosina

**HMGB1** – Hemoglobina glicada

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**HSC** – Células estreladas do fígado

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LEC** – Células do endotélio sinusoidal hepático

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

**NAFLD** – Doença do fígado gorduroso não alcoólica

**NASH** – Esteatohepatite não alcoólica

**NF-κB** – Fator nuclear kappa B

**RAGE** – Receptor para AGE

**RNA** – Ácido ribonucleico

**S100** – Proteína S100

**sRAGE** – Isoforma(s) solúvel de RAGE

**T** – Termolizada

**TGO** – Transaminase glutâmico-oxalacética

**TGP** – Transaminase glutâmico pirúvica

**TT<sub>1</sub>** – Termolizada com adição de tiamina nível 1

**TT<sub>2</sub>** – Termolizada com adição de tiamina nível 2

**UFAL** – Universidade Federal de Alagoas

**VLDL** – Lipoproteína de muito baixa densidade

**γ-GT** – Gama-glutamil transferase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2 CAPÍTULO DE REVISÃO:</b> Produtos de Glicação Avançada (AGEs) e o fígado.....	17
<b>3 ARTIGO DE RESULTADOS:</b> Ingestão crônica de dieta <i>termolizada</i> não promoveu alterações morfo-funcionais em fígado de ratos em envelhecimento.....	30
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	45
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>6 ANEXOS</b> .....	53



Os produtos de glicação avançada ou AGEs, do inglês *advanced glycation end products*, também conhecidos como glicotoxinas, são um grupo de compostos heterogêneos formados por reações não enzimáticas, a partir de interações aminocarbonílicas entre açúcares redutores e seus produtos de oxidação ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006).

Os AGEs têm sido alvo de pesquisas no cenário científico mundial. Um tipo de modificação protéica pós-tradução foi descoberto em 1912, estabelecendo-se na clássica reação de Maillard e, desde então, inúmeros estudos tem sido realizados descrevendo a formação dos produtos de glicação. Em 1953, deu-se a descrição das vias químicas da glicação nos alimentos. Em 1981, descobriu-se que a reação de Maillard ocorria também *in vivo*, contribuindo para o envelhecimento biológico. Em 1992, registrou-se a descoberta do receptor para AGE (RAGE). Em 1997, descobriu-se que os AGEs dietéticos possuem propriedades tóxicas ao organismo, sendo chamados também de glicotoxinas. Na atualidade, a ciência continua ampliando seu conhecimento sobre os produtos de glicação (TESSIER, 2010).

Nesse cenário de avanços científicos, a dieta constitui, inequivocamente, a principal fonte exógena de glicotoxinas, contribuindo significativamente para o aumento do seu *pool* corporal. A ingestão freqüente de alimentos considerados fontes de alto teor de AGEs aumenta os níveis circulantes dessas substâncias, o que, associado ao estresse oxidativo, satura os receptores responsáveis pela degradação de proteínas modificadas pela glicação (KOSCHINSKY et al., 1997; BROWNLEE, 2001; HUEBSCHMANN et al., 2006).

O *pool* corporal de AGEs, portanto, é determinado pela formação endógena dessas substâncias (influenciada pela hiperglicemia e o estresse oxidativo), pelo seu consumo a partir de fontes exógenas, pela sua excreção do organismo, pela sua transmissão via placentária e pela redução da defesa anti-AGE do organismo humano, redução essa especialmente associada ao envelhecimento (MONNIER, 2003; VLASSARA; PALACE, 2003; RAMASAMY et al., 2005). O *pool* corporal de AGEs cronicamente aumentado oferece estímulos para o estresse oxidativo e para o aumento dos níveis de carbonilas reativas

(estresse carbonílico), o que provoca o aumento, por sua vez, da formação dos AGEs, em um ciclo vicioso que leva ao estímulo da interação AGE-RAGE. Através da ligação com seu receptor RAGE, os AGEs induzem a geração de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a inflamação, fenômeno sustentado pela ingestão persistente de níveis aumentados de produtos de glicação (HUEBSCHMANN et al., 2006; BASTA, 2008; SEMBA, 2010).

Nos alimentos, a formação de AGEs é diretamente proporcional à exposição do alimento ao calor seco, ao tempo dessa exposição e à faixa de pH do neutro ao alcalino. Esta formação resulta em uma variedade de produtos que participam na formação de pigmentos castanhos e compostos aromáticos voláteis, em alimentos tratados termicamente. Contudo, estes produtos de glicação reduzem o valor nutritivo da proteína dietética e, quando ingeridos, apresentam papéis tóxicos ao organismo humano, prejudicando a função das biomoléculas (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009).

Em contraposição à geração de AGEs, são encontrados naturalmente nos alimentos compostos protetores, denominados antiglicantes, que também têm sido alvo de pesquisas. Entre eles, a tiamina, uma vitamina termolábil essencial para os seres humanos. Quando o alimento é submetido ao calor seco, além de formar AGEs, produz-se a perda do antiglicante tiamina, podendo reduzir o seu nível endógeno, favorecendo o estresse oxidativo no tecido intestinal, por exemplo, e o aumento de produtos de glicação em fluidos corporais (SHANGARI et al., 2007).

No contexto do *pool* corporal de AGEs aumentado, órgãos como o fígado se tornam alvo dos produtos da glicação. O tecido hepático é particularmente afetado pelo fato do fígado ser o principal local de *clearance* e catabolismo de AGEs circulantes. Há relatos de que as células hepáticas são mais suscetíveis ao estresse oxidativo e ao estresse carbonílico, especialmente promovido pelos produtos de glicação, gerando níveis aumentados de AGEs e níveis reduzidos de tiamina (SHANGARI; MEHTA; O'BRIEN, 2007; HYOGO; YAMAGISHI, 2008).

Neste contexto, em que as células hepáticas estão mais suscetíveis a danos, doenças hepáticas crônicas como a doença do fígado gorduroso não alcoólica (NAFLD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*), por comprometerem o principal órgão de detoxificação de AGEs, prejudicam o seu metabolismo, aumentando os níveis de AGEs circulantes (GUIMARÃES et al., 2010). Estima-se que a prevalência mundial da NAFLD esteja no intervalo de 10 a 24% em várias populações, aumentando sua prevalência para 50 a 75% entre os indivíduos obesos (CARVALHEIRA; SAAD, 2006). Representa, dessa maneira, a causa de doença hepática crônica mais freqüentemente diagnosticada no mundo ocidental, incluindo um espectro de lesões hepáticas que varia de esteatose simples até esteatohepatite não alcoólica (NASH). Neste cenário, crescentes evidências indicam a NAFLD como a manifestação hepática da síndrome metabólica (YILMAZ et al., 2009), havendo associação entre o fígado gorduroso e risco cardiovascular aumentado, constituindo em indivíduos obesos um marcador de resistência à insulina e diabetes (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho de dissertação foi investigar a repercussão metabólica da ingestão crônica de uma dieta submetida a tratamento térmico, denominada *termolizada*, como modelo experimental de indução da formação de produtos de glicação avançada, associada a diferentes níveis de tiamina, em fígado de ratos adultos.

## **2 CAPÍTULO DE REVISÃO**

Produtos de Glicação Avançada (AGEs) e o fígado.

## 1 Introdução

A alimentação típica do ocidente apresenta preferências para alimentos industrializados, fritos, assados e grelhados, aumentando consideravelmente o consumo dos produtos de glicação avançada (AGEs) da dieta. Esse padrão dietético constitui a principal fonte exógena de AGEs, que se somam aos produtos de glicação produzidos no organismo, aumentando a carga corporal dessas substâncias (GOLDBERG et al., 2004; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010; URIBARRI et al., 2010). Os AGEs são formados através de reações não enzimáticas, a partir de interações aminocarbonílicas, entre dicarbonilas de açúcares redutores, produtos de oxidação de carboidratos, aminoácidos, lipídeos e ácido ascórbico, com aminas de aminoácidos, proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006). Essas reações são intensificadas nos alimentos que apresentam faixa de pH do neutro ao alcalino, durante seu processamento térmico com calor seco, sendo proporcional ao tempo de sua exposição às altas temperaturas (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009). No que se refere aos aspectos físico-químicos, os AGEs são caracterizados por fluorescência, cor marrom e ligações cruzadas e, biologicamente, por reconhecimento específico por receptores para AGEs (MATSUMOTO et al., 2000).

Por serem um grupo de compostos heterogêneos, os AGEs dietéticos são absorvidos em graus diferentes, variando de 10 até cerca de 80% de absorção dos compostos presentes nos alimentos, na forma de adutos livres de AGEs, aminoácidos glicosados e produtos de Amadori, estes últimos intermediários precoces no processo de glicação (KOSCHINSKY et al., 1997; FÖRSTER; KÜHNE; HENLE, 2005; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; NAUDÍ et al., 2010).

A ingestão cotidiana de alimentos ricos em AGEs deixa o organismo mais suscetível à glicação, por aumentar o *pool* corporal de AGEs (em síntese, este *pool* é o reflexo da produção endógena, da incorporação de AGEs do ambiente e da eliminação desses compostos do organismo) (BROWNLEE, 2001), processo que satura o sistema de eliminação dos produtos de glicação (HUEBSCHMANN et al., 2006), facilitando o processo

de envelhecimento e a ocorrência de doenças crônicas, como aterosclerose, diabetes e suas complicações, desordens neurodegenerativas, cânceres e amiloidose. O papel dos AGEs nas doenças hepáticas, especificamente, vem sendo alvo de pesquisas, com vistas ao esclarecimento dos mecanismos envolvidos neste processo (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; HYOGO; YAMAGISHI, 2008; BASTA et al., 2011).

O fígado é o principal órgão de *clearance* de AGEs circulantes, tornando-se um alvo fácil para o acúmulo dos AGEs e seus efeitos deletérios (HYOGO; YAMAGISHI, 2008). Em contraposição à formação de AGEs, compostos antioxidantes e antiglicantes, naturalmente encontrados em alimentos, representam um reforço promissor no sentido de reduzir os efeitos deletérios dos AGEs sobre o tecido hepático. Por exemplo, em condições de deficiência de tiamina, uma vitamina de propriedade antioxidante, os hepatócitos ficam mais susceptíveis aos danos causados pelo aumento de carbonilas reativas, de espécies reativas de oxigênio e de formação aumentada de AGEs (SHANGARI; MEHT; O'BRIEN, 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Nesse embate de efeitos, anti e pró-oxidantes, enfermidades de reconhecida importância para a saúde pública mundial, como as doenças hepáticas, podem se estabelecer.

Neste contexto, o objetivo deste capítulo de revisão consistiu em investigar, na literatura científica, a repercussão dos AGEs dietéticos sobre o tecido hepático.

## **2 AGEs dietéticos: absorção, catabolismo hepático e excreção**

A absorção de AGEs da dieta têm sido alvo de investigação na última década, embora permaneçam incertezas quanto ao processo de captação dos AGEs ao nível da barreira intestinal. Koschinsky et al. (1997) trataram deste assunto através de um estudo em humanos, relatando que aproximadamente 10% dos AGEs ingeridos resistiam ao processo digestivo, sendo transportados para a corrente sanguínea como adutos de glicação, junto a peptídeos pequenos e aminoácidos presentes na digestão; 2/3 destes AGEs absorvidos eram retidos no organismo. O epitélio intestinal absorve os produtos de Amadori, os adutos de AGEs livres e os aminoácidos glicosados, entretanto as proteínas altamente glicosadas não

são digeridas eficientemente (KOSCHINSKY et al., 1997; BARBOSA et al., 2009; NAUDÍ et al., 2010; THORNALLEY, 2008). Alguns AGEs dietéticos, tais como a pirralina, podem ser absorvidos em até 80% (FÖRSTER; KÜHNE; HENLE, 2005), diferindo dos resultados encontrados por Koschinsky et al. (1997), para o total de AGEs.

Há evidências de que o AGE carboximetilisina (CML) pode ser absorvido no intestino através de fluxo transepitelial, provavelmente por difusão simples. Depois do processo digestivo, produtos da degradação da CML, e, principalmente, produtos de Amadori são degradados pela microbiota colônica humana e, assim, alguns dos derivados são reabsorvidos no intestino e outros sofrem excreção fecal. O produto de glicação CML absorvido no intestino segue para a corrente sanguínea, podendo agir sobre órgãos alvo como o fígado, os músculos e os rins, ou sofrerem catabolismo no fígado e/ou rins para serem excretados na urina ou via fecal (DELGADO-ANDRADE et al., 2011). As proteínas modificadas por AGEs são degradadas por proteólise celular e os adutos de glicação (frutosil lisina e adutos livres de AGEs) são removidos pelos rins. A extração hepática dessas proteínas modificadas por AGEs é a principal rota de detoxificação dos produtos de glicação avançada (AHMED et al., 2004). Os peptídeos AGEs circulantes, não detoxificados e não excretados do organismo, geram novos produtos de AGEs que reagem com componentes do plasma e outros tecidos, pois permanecem biologicamente ativos, exercendo seus efeitos deletérios aos tecidos, situação presente, por exemplo, em pacientes com disfunção renal (VLASSARA; PALACE, 2003; ANSARI; RASHEED, 2009).

Os níveis séricos de AGEs refletem o equilíbrio entre a ingestão oral, a formação endógena e a taxa de catabolismo. Este catabolismo depende da degradação tecidual dos produtos de glicação, ocorrida principalmente no fígado, e da excreção de AGEs do organismo. O aumento dos níveis de AGEs circulantes exerce efeito prejudicial para o organismo, particularmente para o fígado (HORIUCHI, 2002; GUIMARÃES et al., 2010; BASTA et al., 2011). Em um estudo experimental, mais que 90% de AGE-BSA (albumina sérica bovina ligada a produtos de glicação avançada) foi detoxificado por células do

sinusóide hepático dentro de 15 minutos após sua injeção intravenosa (MATSUMOTO et al., 2000). Neste contexto, há relatos que sugerem os níveis de AGEs circulantes como um biomarcador útil para avaliar a função hepática residual e para distinguir esteatohepatite não alcoólica de esteatose simples (PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2002; HYOGO; YAMAGISHI, 2008).

Compostos precursores de AGEs, como glioxal e metilglioxal, são detoxificados pelo sistema de glioxalase celular, consistindo de glioxalase-I e II, as quais convertem compostos precursores de AGEs em lactato e finalmente piruvato. A capacidade de endocitose de AGEs é reduzida no fígado envelhecido, resultando em repercussões negativas sobre a circulação sistêmica e deposição extra-hepática destes resíduos de macromoléculas (KUHLA; TRIEGLAFF; VOLLMAR, 2011).

O fígado, um órgão alvo para AGEs, por ser um local de *clearance* e de catabolismo desses compostos, pode sofrer glicação de seus componentes estruturais e redução da capacidade funcional dos receptores *scavenger* prejudicando, por sua vez, o metabolismo dos próprios AGEs, estabelecendo-se, portanto, um ciclo vicioso. O *clearance* destes produtos de glicação é realizado por vários tipos de células hepáticas, tais como células de Kupffer e células do endotélio sinusoidal hepático. Além destas, os hepatócitos também atuam na detoxificação dos AGEs (HANSEN et al., 2002; HYOGO; YAMAGISHI, 2008; BASTA, 2011). A função catabólica do fígado é possível devido à presença de receptores *scavenger* nas células supra citadas, realizando endocitose, desintoxicação e catabolismo de AGEs. Pelo fato do fígado ser o principal órgão de catabolismo de AGEs, qualquer receptor *scavenger* pode atuar no processo de endocitose que envolve esses compostos. No entanto, há relatos de que os receptores *scavenger* envolvidos na endocitose de AGEs são distintos dos receptores *scavenger* classe A e parecem reconhecer AGEs e LDL oxidada como ligantes (HANSEN et al., 2002; BASTA, 2011).

Após a endocitose, a degradação de AGEs ocorre de maneira mais lenta, quando comparada à degradação de outros ligantes dos receptores *scavenger*, reduzindo a

capacidade endocítica mediada por estes receptores, prejudicando provavelmente o mecanismo normal de dissociação entre ligante e receptor, no compartimento endossômico inicial. Há também o prejuízo do transporte intracelular de seus ligantes, havendo degradação do compartimento endossômico-lisossomal, o que leva à redução da capacidade funcional deste receptor, sendo necessária nova síntese protéica para o reaparecimento da capacidade de detoxificação pelo receptor *scavenger* na superfície celular (HANSEN et al., 2002).

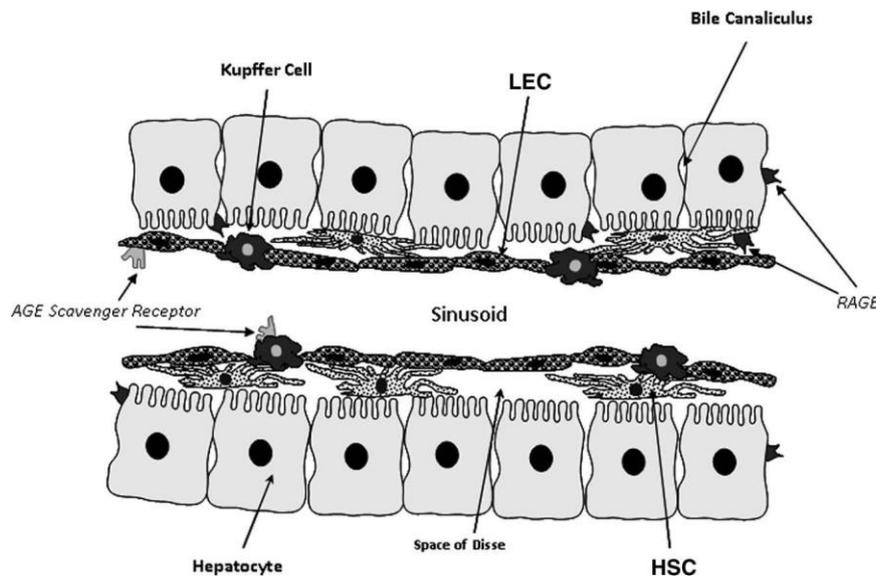
Os AGEs remanescentes do processo de catabolismo, então, permanecem no tecido, podendo exercer seus efeitos deletérios por meio de diversos mecanismos, desde a interação com diversas proteínas, comprometendo suas características estruturais e funcionais, até a associação com receptores que acionam uma cadeia de eventos específicos que podem comprometer a função celular.

### **3 AGEs e fígado:**

Ao contrário dos receptores *scavenger*, que fazem a detoxificação dos AGEs do meio circulante, degradando-os, existe outro tipo de receptor, membro multiligante da superfamília das imunoglobulinas de moléculas de superfície celular, que está associado à inflamação e ao estresse oxidativo, o RAGE (receptor para AGE). O RAGE possui a característica de polimorfismo, possuindo isoformas solúveis (sRAGE e esRAGE), além da estrutura transmembrana. A função exata de cada isoforma de RAGE precisa ser mais bem esclarecida, pois o uso de métodos generalistas para a identificação de RAGE e suas isoformas, por não distinguí-las fidedignamente, fornece dados controversos. A localização do RAGE e do receptor *scavenger* no fígado é demonstrada na figura 1 (BASTA, 2008; BASTA et al., 2011). Entre as várias vias capazes de ativar a sinalização intracelular envolvida nas doenças hepáticas, os AGEs e seu receptor RAGE estão envolvidos na patogênese e progressão da doença do fígado gorduroso não alcoólica. Em particular, a interação entre AGEs e RAGE provoca geração de estresse oxidativo e, posteriormente,

altera a expressão de genes em vários tipos de células, incluindo hepatócitos e células estreladas do fígado (D'ADAMO et al., 2011).

O RAGE possui uma região extracelular formada de um domínio de imunoglobulina do tipo V e dois domínios de imunoglobulina do tipo C, seguidos por um único e curto domínio transmembrânico e curto domínio citoplasmático, que é essencial para a transdução do sinal mediado por essa proteína (NEEPER et al., 1992; SCHMIDT et al., 2000; BASTA et al., 2011). Isoformas solúveis (tais como sRAGE) são detectáveis no soro humano, sendo capazes de se ligar ao AGE e concorrer com o RAGE para esta ligação, apresentando efeitos citoprotetores, uma vez que parecem não mediar a transdução de sinal intracelular (YONEKURA et al., 2003; SCHLUETER et al., 2003; BASTA, 2008; BASTA et al., 2011).



**Figura 1** Localização do receptor *scavenger* para AGE e do RAGE no fígado. Receptores *scavenger* para AGE estão presentes em células de Kupffer e células endoteliais do sinusóide hepático, enquanto RAGE está localizado nos hepatócitos e nas células estreladas do fígado. AGE: produto de glicação avançada. RAGE: receptor para AGE. LEC: células do endotélio sinusoidal hepático. HSC: células estreladas do fígado. Adaptada de Basta et al., 2011.

O AGE é um ligante ocasional de RAGE, que recebeu este nome pelos AGEs terem sido os primeiros ligantes a serem descobertos para este receptor. Outros ligantes de RAGE consistem em citocinas pró-inflamatórias S100/calgranulinas, HMGB1, peptídeo  $\beta$  amilóide, fibrilas de folhas  $\beta$ , entre outros (BASTA et al., 2011). Os AGEs representam o foco da atual

revisão por sua veiculação através da dieta. Semelhantemente ao que ocorre no endotélio vascular, níveis aumentados de AGEs favorecem a interação AGE-RAGE no fígado, que leva a sinais de estresse oxidativo intracelular e aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo os genes do próprio RAGE (BASTA, 2008; BASTA et al., 2011).

No fígado e no sangue, particularmente, marcadores oxidativos e inflamatórios podem ser indicativos das características pró-oxidativas e pró-inflamatórias dos AGEs (dietéticos e produzidos no organismo), estabelecendo possível correlação com o estresse oxidativo e com a inflamação, respectivamente, sugerindo relação direta entre AGEs dietéticos, *pool* corporal de AGEs e lesão hepática associada à doença hepática crônica (VLASSARA et al., 2002; HYOGO; YAMMAGISHI, 2008). Em um estudo *in vitro*, observou-se que os AGEs aumentam a ativação e a proliferação das células estreladas do fígado, fenômeno associado à geração intracelular de espécies reativas de oxigênio e à produção de citocinas pró inflamatórias nessas células. Isto sugere um mecanismo molecular pelo qual os AGEs contribuem para a fibrose e inflamação hepáticas relacionadas a uma doença hepática em particular, a esteato hepatite não alcoólica (IWAMOTO et al., 2008).

Em certas doenças crônicas, tais como doença hepática crônica, doença renal crônica, diabetes, síndrome metabólica, no envelhecimento e por ocasião da ingestão aumentada de AGEs, ocorre a formação acelerada de produtos de glicação pelo aumento de substratos contendo grupos amina e carbonila reativos, e pelo metabolismo prejudicado dos próprios AGEs no fígado e/ou no rim, órgãos que contribuem para o *clearance* e a excreção desses produtos do organismo. Além dos níveis aumentados de AGEs, tais condições estão relacionadas ao estado oxidativo e inflamatório no tecido hepático (HYOGO; YAMAGISHI, 2008; GUIMARÃES et al., 2010).

Considerando-se o processo de estresse oxidativo, os AGEs podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio através da interação com o RAGE e, independente de RAGE, através da redução de antioxidantes ou pela formação intracelular de derivados glicoxidantes (HUEBSCHMANN et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Contribuindo para o processo inflamatório crônico, por outro lado, operam mecanismos

dependentes de RAGE, pelos quais há a ativação de cascata inflamatória (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006). Por isso, o aumento da carga corporal de AGEs pode contribuir para o estabelecimento do estresse oxidativo e da inflamação, condições com provável relação direta ao metabolismo diminuído de AGEs, aumentando seus níveis circulantes e a susceptibilidade de células hepáticas e intestinais à toxicidade desses compostos (SHANGARI et al., 2007; SHANGARI; MEHTA; O'BRIEN, 2007).

A alanina aminotransferase (ALT), uma enzima transaminase, com meia vida biológica de cerca de três dias, pode ser glicada *in vitro* por vários açúcares, sugerindo também a possibilidade de sua glicação intracelular, uma vez que possui de 15 a 20 aminoácidos lisina (aminoácido com grupo amina disponível para reação). A ALT está presente em tecidos glicolíticos e parece estar envolvida no metabolismo de aminoácidos e carboidratos. Desta forma, a glicação da molécula da enzima pode influenciar, portanto, o metabolismo intermediário e sua regulação (BERÁNEK et al., 2001).

Para investigar o papel dos produtos de glicação na fisiopatologia hepática, estudos pré clínicos demonstraram que os AGEs prejudicam a função *scavenger* de células do endotélio sinusoidal do fígado de ratos, perturbando o sistema de transporte intracelular dos produtos de glicação, com conseqüente aumento de seus próprios níveis circulantes, perpetuando o eixo AGE-RAGE no organismo (HANSEN et al., 2002). A ativação de RAGE pode contribuir para processos pró-inflamatórios destrutivos do tecido hepático. Há relatos de que RAGE medeia a resposta ao estresse durante ressecção hepática e inicia eventos que reduzem a regeneração deste órgão, enquanto que o bloqueio de RAGE parece ser uma estratégia promissora para promover regeneração em massa do fígado lesionado. Embora RAGE tenha uma função protetora na prevenção da fibrose pulmonar, este receptor parece estar envolvido nos mecanismos de liderança para a fibrose renal e hepática (BASTA et al., 2011).

No âmbito dos estudos clínicos, Butscheid et al. (2007) não encontraram diferença nos níveis séricos de CML em pacientes com hepatite C (com ou sem esteatose), doença de fígado gorduroso não alcoólico ou esteatoepatite não alcoólica (BUTSCHEID et al., 2007).

Entretanto, em pacientes com cirrose hepática, níveis aumentados de CML circulante (o AGE mais importante biologicamente) tiveram correlação positiva com a gravidade da doença e foram inversamente associados com a função hepática residual dos pacientes, estimada por níveis de albumina sérica e bilirrubina plasmática. Adicionalmente, três meses após o transplante hepático, esses pacientes tiveram os níveis plasmáticos de CML diminuídos pela metade daqueles anteriores ao tratamento (SEBEKOVA et al., 2002; HYOGO; YAMAGISHI, 2008; BASTA et al., 2011). Esse fato associado ao ciclo vicioso, no qual a doença hepática crônica prejudica o catabolismo hepático de AGEs, aumentando seus níveis circulantes, o estresse oxidativo e o estresse carbonílico, prejudicando adicionalmente a função fisiológica do fígado, fazem dos níveis de AGEs circulantes potenciais biomarcadores úteis para avaliar a função hepática residual (HYOGO; YAMAGISHI, 2008).

Ao comparar indivíduos saudáveis com indivíduos com doença hepática crônica, estes últimos apresentaram significativamente maiores níveis séricos de CML, associados com perda da capacidade funcional hepática (YAGMUR et al., 2006; BASTA et al., 2011). Ainda há muito a se esclarecer sobre o assunto, mas os resultados de estudos prévios sugerem que um prejuízo moderado na função hepática não afeta o nível circulante de CML, o qual se eleva em pacientes com cirrose grave, resultante do catabolismo reduzido de AGEs. Nesses casos relatados por Basta et al., (2011), a CML não causou a cirrose hepática (BASTA et al., 2011).

Ainda em estudos clínicos, AGEs foram detectados em hepatócitos de pacientes com NASH (esteato hepatite não alcoólica, do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*), mas não em indivíduos com esteatose simples. Em material de biopsia hepática de indivíduos saudáveis ou com esteato hepatite, hepatite relacionada a vírus, colestase ou cirrose, foram detectados CML e RAGE nos hepatócitos de todos os pacientes, inclusive os saudáveis (BUTSCHEID et al., 2007; BASTA et al., 2011). Em condição diferente, em células do hepatoma humano expostas a AGEs, a interação AGE-RAGE estimulou a proteína C reativa hepática através de duas vias: 1) via dependente de espécies reativas de oxigênio, mediada

pela NADPH oxidase, envolvendo Rac-1; 2) sinal induzido por transdutor Rac-1 e ativador da transcrição 3- e uma dependente de NF- $\kappa$ B, que não é diretamente mediada por espécies reativas de oxigênio. A expressão de RNA mensageiro de RAGE é menor no fígado normal que no fígado com hepatite e maior no carcinoma hepatocelular, indicando que a interação AGE-RAGE também acontece nessas doenças (HYOGO; YAMAGISHI, 2008).

Estes achados associam-se ao fato de que a doença do fígado gorduroso não alcoólica tem sido a causa mais freqüentemente diagnosticada de doença hepática crônica e que a população ocidental ingere cada vez mais alimentos com alto teor de AGEs, proporcionando ao organismo um ambiente favorável ao estresse oxidativo e à inflamação, condições estas presentes no desenvolvimento da doença hepática crônica (YILMAZ et al., 2009; SEMBA, 2010; BASTA et al., 2011). Com vistas a prevenção de estados oxidativos e inflamatórios crônicos associados aos produtos de glicação, particularmente relacionados ao tecido hepático, estratégias terapêuticas têm sido alvo de pesquisas a considerar a terapia nutricional como forte aliada da prevenção e tratamento de doenças hepáticas crônicas.

#### **4 Perspectivas terapêuticas**

Ainda há muito a ser esclarecido sobre as estratégias terapêuticas anti-AGE para o tecido hepático normal (prevenção) e para a doença hepática crônica já instalada. No entanto, em outras doenças como no diabetes já existem fármacos sendo utilizados na prevenção e no tratamento das complicações diabéticas em seres humanos, a exemplo da benfotiamina que possui papel inibidor da formação de AGEs (HUEBSCHMANN et al., 2006). No âmbito do tecido hepático, a tiamina, uma vitamina termolábil, está sendo investigada, do ponto de vista de seu papel antiglicante, sendo testada atualmente em estudos experimentais para posteriormente ser aplicada em humanos; se os estudos pré clínicos indicarem que a tiamina protege os organismos vivos contra os efeitos deletérios dos AGEs, poderá se constituir um importante adjuvante no controle desse fenômeno (SHANGARI; MEHTA; O'BRIEN, 2007).

A tiamina possui um papel na regeneração da glutatona oxidada para sua forma reduzida, através da manutenção dos níveis celulares de NADPH, aumentando a defesa antioxidante celular em células intestinais (SHANGARI et al., 2007). Em células hepáticas, a ingestão de dieta suplementada com tiamina ajuda a manter a detoxificação de glioxal e metilglioxal, contribuindo para a redução do estresse carbonílico e a formação de AGEs, protegendo o fígado do efeito prejudicial exercido pelo estresse oxidativo e carbonílico (SHANGARI; MEHT; O'BRIEN, 2007).

Outro modo de prevenir o estresse oxidativo, o estresse carbonílico e a inflamação estimulada pelos AGEs é a inibição do receptor RAGE. A administração da isoforma solúvel sRAGE é um modo de inibição do receptor de superfície celular RAGE, uma vez que sRAGE compete com RAGE e não medeia a transdução de sinal intracelular (BASTA, 2008; YILMAZ et al., 2009).

No contexto científico, existem também expectativas sobre o estabelecimento do nível seguro de ingestão dos produtos de glicação da dieta, ou seja, um valor que corresponderia à quantidade limite de AGEs que o organismo poderia absorver, detoxificar e não sofrer os efeitos prejudiciais relacionados à glicação, ao estresse oxidativo e à inflamação crônica, correlacionados com o aumento do *pool* endógeno de AGEs. A partir da identificação dos limites de ingestão de AGEs, pode-se avaliar a alimentação consumida pelas populações e orientar mais precisamente dietas com teores reduzidos de AGEs.

## 5 Conclusão

Está estabelecido que a quantidade aumentada de AGEs dietéticos consumida cotidianamente aumenta o *pool* corporal pós-prandial de AGEs circulantes e, como consequência, no tecido hepático. Existem controvérsias acerca do papel dos AGEs na doença hepática crônica, demonstrando a necessidade de estudos adicionais que esclareçam os mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo, proporcionando, assim, a identificação de vias desencadeadas pelos produtos de glicação, que possam ser alvos promissores de intervenção terapêutica. Do mesmo modo, ao considerar a associação dos

AGEs com o processo inflamatório e oxidativo, compostos antiglicantes encontrados naturalmente nos alimentos ou suplementados na dieta, tais como a vitamina tiamina, parecem constituir estratégias promissoras que, adicionadas à redução do consumo de AGEs dietéticos possibilitem a otimização de intervenções relacionadas à manutenção do período de vida saudável e à terapêutica da doença hepática crônica.

### **3 ARTIGO DE RESULTADOS**

SILVA, EBO; OLIVEIRA, SL; ATAÍDE, TR. Ingestão crônica de dieta *termolizada* não promoveu alterações morfo-funcionais em fígado de ratos em envelhecimento.

## RESUMO

Os produtos de glicação avançada (AGEs) dietéticos e os AGEs formados no organismo apresentam propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatórias. O processamento com calor seco também reduz substâncias antioxidantes e antiglicantes, como a vitamina tiamina. Tais condições favorecem o estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios que podem desencadear alterações fisiopatológicas no fígado, um alvo particular. Este trabalho objetivou investigar a repercussão da ingestão crônica de dieta termolizada, associada a diferentes quantidades de tiamina sobre as características morfo-funcionais do tecido hepático. Ratos machos *Wistar*, de cinco meses de idade, foram subdivididos em quatro grupos experimentais: controle (C), dieta comercial padrão; *termolizada* (T), dieta padrão autoclavada a 121,5°C, por 30 min; *termolizada* com tiamina nível 1 (TT<sub>1</sub>), dieta *termolizada* acrescida, após tratamento térmico, de 6 mg de tiamina/Kg de dieta; e *termolizada* com tiamina nível 2 (TT<sub>2</sub>), dieta *termolizada* acrescida de 120 mg de tiamina/Kg de dieta. Após 23 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados, procedeu-se à coleta de amostras de sangue e de fígado para a análise histológica do tecido hepático e as determinações bioquímicas séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), albumina, proteínas totais, bile direta, bile indireta, bile total, glicose e perfil lipídico. Não foram detectadas alterações histológicas nas amostras de fígado e nenhuma alteração bioquímica sérica. O consumo crônico de dieta *termolizada* não promoveu o aparecimento de alterações morfofuncionais hepáticas em ratos adultos. É possível considerar que elementos antioxidantes e antiglicantes, bem como a composição em nutrientes da dieta comercial de base podem ter contribuído para os resultados obtidos.

## PALAVRAS-CHAVE

Dieta, glicação, tiamina, fígado

## ABSTRACT

Dietary advanced glycation end products (AGEs) and AGEs formed in the body have pro-oxidative and pro-inflammatory properties. The dry heat processing also reduces

antioxidants and anti-glycation substances such as vitamin thiamin. Both of them favor oxidative stress and inflammatory mechanisms that can trigger pathophysiological changes in the liver, a particular target. This study aimed to investigate the effect of chronic *thermolyzed* diet ingestion, associated with different amounts of thiamin on the morphofunctional characteristics of the liver tissue. Male Wistar rats with five months old were divided into four groups: control (C), master commercialized diet; *thermolyzed* (T), autoclaved diet at 121,5°C for 30 min; *thermolyzed* with level 1 (TT<sub>1</sub>) thiamin, *thermolyzed* diet increased after heat treatment, 6 mg of thiamin/kg of diet; and *thermolyzed* with level 2 thiamin (TT<sub>2</sub>), *thermolyzed* diet plus 120 mg thiamin/kg of diet. After 23 weeks of treatment, animals were anesthetized and euthanized, proceeded to the histological analysis of hepatic tissue and biochemical serum tests such as aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (γ-GT), albumin, total protein, bile direct, bile indirect, total bile, glucose and lipid profile. There were no histologic changes were detected in liver samples, and no serum biochemical changes. The chronic consumption of *thermolyzed* diet did not promote the appearance of morphological and functional hepatic alterations in adult rat. It is possible to suggest that anti-glycation and antioxidants elements, as well as, the nutrient composition of control diet may have contributed to the see findings.

## **KEYWORDS**

Diet, glycation, thiamin, liver

## **1 INTRODUÇÃO**

O modelo de dieta ocidental que utiliza preferencialmente técnicas culinárias com calor seco, associada ao seu consumo por um período prolongado durante o curso da vida, está fortemente relacionado a doenças crônicas como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e doença do fígado gorduroso não alcoólica. Esta última constitui a causa mais freqüentemente diagnosticada de doença hepática crônica, classificada de esteatose simples até esteato hepatite não alcoólica (YILMAZ et al., 2009; TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010).

Semelhantemente a esse padrão alimentar, a dieta *termolizada* fornece estresse oxidativo exógeno, favorece a formação de produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end products*) e reduz consideravelmente o conteúdo de tiamina, uma vitamina termolábil, com ação antiglicante e essencial para seres humanos. A tiamina possui um papel na regeneração da glutathione oxidada para sua forma reduzida, através da manutenção dos níveis celulares de NADPH, aumentando a defesa antioxidante primária da célula. Adicionalmente, a ingestão de dieta suplementada com tiamina ajuda a manter a detoxificação de dicarbonilas altamente reativas, contribuindo para a redução do estresse carbonílico e da formação de AGEs (SHANGARI et al., 2007; SHANGARI; MEHT; O'BRIEN, 2007). A tiamina pode, também, auxiliar na prevenção de desordens vasculares na população diabética, com freqüente deficiência nesta vitamina com ação anti-AGE (BABAEI-JADIDI et al., 2004).

A ingestão de alimentos com alto teor de AGEs possibilita o aumento de seus níveis circulantes pós-prandiais, os quais se somam aos AGEs produzidos no organismo, aumentando seu *pool* corporal (URIBARRI et al., 2010), reagindo e glicando proteínas sanguíneas, como a lipoproteína de alta densidade (FERRETTI et al., 2006), a lipoproteína de baixa densidade (ISODA et al., 2008) e a alanina aminotransferase (BERÁNEK; DRŠATA; PALIČKA, 2001). Os produtos de glicação também realizam ligações cruzadas com proteínas teciduais, a exemplo do colágeno e da elastina no tecido vascular, reduzindo a elasticidade arterial (VASDEV; GILL; SINGAL, 2007).

No fígado, a interação dos AGEs com seu receptor de superfície celular (RAGE) contribui para processos pró-inflamatórios e pró-oxidativos prejudiciais ao tecido hepático. Devido à função hepática no metabolismo de macromoléculas, incluindo catabolismo e *clearance* de AGEs, o fígado é alvo para os produtos de glicação, podendo ter seus componentes estruturais glicosados e reduzida a sua capacidade de detoxificação de AGEs circulantes pelos receptores *scavenger* de células endoteliais do sinusóide hepático, células de Kupffer e hepatócitos. A redução desta capacidade de detoxificação de AGEs possibilita aumento do nível circulante destes compostos, estabelecendo, portanto, um ciclo vicioso

(HANSEN et al., 2002; HYOGO; YAMAGISHI, 2008; BASTA, 2011). Em condições particulares como na deficiência de tiamina, este ciclo é intensificado pelo aumento do estresse oxidativo e carbonílico, tornando o hepatócito mais suscetível aos efeitos deletérios do aumento do *pool* corporal dos produtos da glicação avançada (SHANGARI; MEHT; O'BRIEN, 2007).

Com vistas ao exposto anteriormente, o objetivo deste estudo foi investigar a repercussão do consumo crônico de dieta submetida a processamento térmico, denominada dieta *termolizada*, associada a diferentes níveis de tiamina, sobre parâmetros morfofuncionais hepáticos, utilizando como modelo experimental ratos *Wistar* em envelhecimento.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Animais e dietas

Trinta ratos *Wistar* provenientes do Biotério Central da UFAL, recém-desmamados, foram mantidos no Biotério Setorial da FANUT ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ; ciclo claro/escuro de 12 horas; e controle de umidade), em gaiolas coletivas, até completarem cinco meses de idade, quando foram acondicionados em gaiolas semi-metabólicas individuais. Foram distribuídos, de maneira a uniformizar o peso inicial e a influência do ambiente, em quatro grupos, submetidos a diferentes dietas, tendo como base a dieta comercial padrão (Labina®, Purina) em *pellet*, como se segue: grupo C, recebeu dieta controle (padrão;  $n=8$ ); grupo T, dieta *termolizada* (dieta padrão submetida a processo térmico, a  $121,5^\circ\text{C}$ , por 30 min;  $n=7$ ); grupo TT<sub>1</sub>, dieta *termolizada*, com adição de níveis de tiamina compatíveis com os recomendados pelo *American Institute of Nutrition* para a espécie (6mg tiamina/Kg de dieta;  $n=7$ ); e grupo TT<sub>2</sub>, dieta *termolizada* suplementada com 20 vezes o valor recomendado de tiamina (120mg tiamina/Kg de dieta;  $n=8$ ). A adição de tiamina foi realizada após o tratamento térmico da dieta *termolizada*; para tanto, devido à labilidade térmica da tiamina, as dietas TT<sub>1</sub> e TT<sub>2</sub> foram ofertadas no formato em pó. Dieta e água foram ofertadas *ad libitum* e o controle da ingestão alimentar e do ganho de peso realizados semanalmente.

A elaboração da dieta *termolizada* seguiu o protocolo estabelecido por Shangari et al. (2007), submetendo-se a dieta a um tratamento térmico em autoclave (Vertical Phoenix), por três ciclos prévios de cinco minutos, seguidos por um último ciclo de 121,5°C, por 30 min, com intervalo de dez minutos entre cada ciclo. Para elaboração das dietas *termolizadas* suplementadas com tiamina, em dois níveis de suplementação, a dieta *termolizada* foi triturada e acrescida das quantidades correspondentes da vitamina.

O período experimental estendeu-se por 23 semanas. Ao término desse período, os animais foram submetidos a jejum de 12h e, posteriormente, anestesiados (ketamina, 100 mg/kg i.p e xilazina, 15 mg/kg i.p), para coleta de amostras de fígado e de sangue. As amostras de sangue foram centrifugadas (3500 x g, 20 min) para obtenção do soro. Para a análise histológica hepática, fragmentos do lobo esquerdo do fígado foram imersos em formol a 10%, para fixação.

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através do processo de Nº 003705/2009-76.

## 2.2 Análises bioquímicas

Para avaliação da integridade do tecido hepático, foram determinados os níveis séricos de colesterol, HDL, VLDL, LDL, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), albumina, globulinas, proteínas totais, bilirrubina direta, bilirrubina indireta e bilirrubinas totais. Adicionalmente, determinou-se a concentração sérica de glicose. Todas as mensurações foram realizadas através de medições espectrofotométricas, por meio de *kits* laboratoriais, em Laboratório da rede credenciada de Maceió (UNILAB).

## 2.3 Análise histológica do fígado

Após fixação em formol a 10%, o órgão foi clivado, adotando-se cortes transversais. Os fragmentos obtidos foram processados em álcool, xilol e parafina líquida (preguição) e, posteriormente, incluídos em bloco de parafina. Para elaboração das lâminas histológicas, a

etapa da coloração foi realizada pelo método hematoxilina-eosina (HE), após o processamento e inclusão em parafina.

#### 2.4 Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

Para análise da qualidade global das dietas e sua repercussão no crescimento dos animais, calculou-se o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), para o período, através dos registros de ganho de peso e de ingestão semanal, por meio da seguinte fórmula:

$$CEA = \text{ganho de peso (g)} \times 100 / \text{consumo alimentar (g)}$$

#### 2.5 Análises estatísticas

Foram analisados os pressupostos paramétricos de normalidade e homocedasticidade, através dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene. Como nenhuma das variáveis apresentou os pressupostos paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação das distribuições e, quando apresentaram diferença significativa, utilizou-se o teste *post hoc* de Nemenyi. Para o desdobramento em tempo das médias dos dados de peso, ingestão, ganho de peso e CEA, utilizou o teste de Nemenyi. Como nível de significância, adotou-se até 5% de significância.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

Não houve diferença significativa entre os grupos (C, T, TT<sub>1</sub>, TT<sub>2</sub>), no que diz respeito ao CEA, nos seis meses correspondentes ao experimento. No entanto, em relação ao peso dos animais, durante o segundo mês de experimento, a média de peso do grupo C foi significativamente maior que a média de peso do grupo TT<sub>2</sub>; durante o terceiro mês, a média de peso do grupo C foi significativamente maior que a média de peso dos grupos TT<sub>1</sub> e TT<sub>2</sub>, e, nesse mesmo período, a média de peso do grupo T foi significativamente maior que a média de peso do grupo TT<sub>2</sub>; durante o quarto, o quinto e o sexto mês, as médias de peso

dos grupos C e T foram significativamente maiores que as médias de peso dos TT<sub>1</sub> e TT<sub>2</sub>. Durante o período experimental, a média do CEA dos animais do grupo C no último mês foi significativamente menor que a média do CEA deste grupo nos quatro primeiros meses; no grupo TT<sub>1</sub>, a média do CEA dos animais no primeiro mês foi significativamente maior que a média do CEA no quinto e no sexto mês; no grupo TT<sub>2</sub>, a média do CEA dos animais no sexto mês foi significativamente menor que a média do CEA no primeiro, no segundo e no quarto mês. O ganho de peso dos quatro grupos (C, T, TT<sub>1</sub> e TT<sub>2</sub>) não diferiu significativamente dentro do mesmo grupo nem entre os grupos durante o período experimental.

A apresentação das dietas, em *pellet* ou pó, não implicou em diferença no consumo pelos grupos bem como no ganho de peso, conforme verificado na Tabela 1.

**Tabela 1** Peso e Coeficiente de Eficiência Alimentar dos grupos experimentais submetidos às dietas controle (C), *termolizada* (T), *termolizada* acrescida de níveis fisiológicos de tiamina (TT1) e *termolizada* acrescida de níveis suplementares de tiamina (TT2), após 23 semanas de período experimental.

VARIÁVEIS ANALISADAS	GRUPOS (dietas)	PERÍODO EXPERIMENTAL (meses)					
		1	2	3	4	5	6
PESO (g)	C	328,94 <sup>aA</sup>	349,86 <sup>aA</sup>	378,46 <sup>aB</sup>	390,05 <sup>aB</sup>	396,08 <sup>aB</sup>	395,81 <sup>aB</sup>
	T	323,31 <sup>aA</sup>	346,55 <sup>abAB</sup>	368,80 <sup>abBC</sup>	388,63 <sup>aC</sup>	395,46 <sup>aC</sup>	396,56 <sup>aC</sup>
	TT1	313,36 <sup>aA</sup>	337,87 <sup>abAB</sup>	352,02 <sup>bcB</sup>	358,48 <sup>bb</sup>	360,05 <sup>bb</sup>	362,63 <sup>bb</sup>
	TT2	304,37 <sup>aA</sup>	321,96 <sup>abAB</sup>	334,21 <sup>cAB</sup>	343,12 <sup>bb</sup>	345,29 <sup>bb</sup>	346,92 <sup>bb</sup>
CEA	C	2,78 <sup>ab</sup>	2,72 <sup>ab</sup>	2,36 <sup>ab</sup>	2,32 <sup>ab</sup>	1,16 <sup>aAB</sup>	0,49 <sup>aA</sup>
	T	2,01 <sup>aA</sup>	2,56 <sup>aA</sup>	2,73 <sup>aA</sup>	2,37 <sup>aA</sup>	1,26 <sup>aA</sup>	1,12 <sup>aA</sup>
	TT1	3,64 <sup>ab</sup>	2,02 <sup>aAB</sup>	1,77 <sup>aAB</sup>	2,04 <sup>aAB</sup>	1,31 <sup>aA</sup>	0,60 <sup>aA</sup>
	TT2	2,39 <sup>ab</sup>	2,32 <sup>ab</sup>	2,04 <sup>aAB</sup>	2,21 <sup>ab</sup>	1,52 <sup>aAB</sup>	0,30 <sup>aA</sup>
INGESTÃO (g)	C	169,97 <sup>aD</sup>	172,16 <sup>aE</sup>	156,85 <sup>aA</sup>	159,59 <sup>aC</sup>	157,37 <sup>ab</sup>	173,18 <sup>aF</sup>
	T	170,83 <sup>aE</sup>	169,54 <sup>aD</sup>	159,02 <sup>aB</sup>	161,71 <sup>aC</sup>	158,68 <sup>aA</sup>	183,17 <sup>aF</sup>
	TT1	165,54 <sup>aE</sup>	145,19 <sup>aC</sup>	151,75 <sup>aD</sup>	143,52 <sup>aB</sup>	143,46 <sup>aA</sup>	169,14 <sup>aF</sup>
	TT2	163,78 <sup>aE</sup>	148,14 <sup>aD</sup>	146,85 <sup>aC</sup>	140,72 <sup>aB</sup>	139,89 <sup>aA</sup>	167,86 <sup>aF</sup>
GANHO DE PESO (g)	C	7,66 <sup>aA</sup>	7,68 <sup>aA</sup>	3,75 <sup>aA</sup>	3,27 <sup>aA</sup>	1,85 <sup>aA</sup>	-5,07 <sup>aA</sup>
	T	5,20 <sup>aA</sup>	1,86 <sup>aA</sup>	7,65 <sup>aA</sup>	4,28 <sup>aA</sup>	0,44 <sup>aA</sup>	1,55 <sup>aA</sup>
	TT1	0,44 <sup>aA</sup>	7,66 <sup>aA</sup>	6,97 <sup>aA</sup>	-1,75 <sup>aA</sup>	-0,23 <sup>aA</sup>	1,04 <sup>aA</sup>
	TT2	4,88 <sup>aA</sup>	4,43 <sup>aA</sup>	1,09 <sup>aA</sup>	2,67 <sup>aA</sup>	0,02 <sup>aA</sup>	0,34 <sup>aA</sup>

Os valores de peso, de CEA, de ingestão e de ganho de peso representam a média de cada grupo; em virtude de a análise utilizada ser não paramétrica, não se dispôs de medidas de dispersão. Letras minúsculas diferentes na coluna representam diferenças significativas.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas. Pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Nemenyi ( $P < 0,05$ ). Fonte: autora desta dissertação, 2012.

### 3.2 Avaliação bioquímica do soro

De acordo com as análises bioquímicas séricas, verifica-se, conforme a Tabela 2, que não houve diferença significativa entre os dados de função hepática (albumina, globulinas, proteínas totais, bilirrubinas, glicose), lesão hepática (AST, ALT,  $\gamma$ -GT, FA) e perfil lipídico (colesterol, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos) dos grupos estudados.

**Tabela 2** Análises séricas de ratos submetidos à dieta controle, *termolizada*, *termolizada* acrescida de níveis fisiológicos de tiamina e *termolizada* acrescida de níveis suplementares de tiamina, após 23 semanas de período experimental.

PARÂMETRO BIOQUÍMICO	GRUPO C	GRUPO T	GRUPO TT <sub>1</sub>	GRUPO TT <sub>2</sub>	Significância Estatística P
Colesterol	89	92,28	87,8	101	0,343
HDL	30,14	30,43	29,6	32,83	0,216
VLDL	30,94	36,31	26,64	27,17	0,713
LDL	27,91	25,54	31,56	41	0,365
Triglicerídeos	154,71	181,57	133,2	135,83	0,713
AST	155,57	166,43	175,2	178,5	0,839
ALT	80,29	74,14	71,8	75,83	0,954
Fosfatase alcalina	105,43	96	91	100,83	0,568
Gama GT	0,14	0,57	0,4	0,33	0,781
Proteínas totais	6,03	5,90	6,08	5,97	0,630
Albumina	2,80	2,81	2,87	2,86	0,878
Globulinas	3,21	3,1	3,22	3,1	0,612
Glicose	190,71	202,14	175,2	171,33	0,840
Bilirrubinas totais	0,16	0,20	0,14	0,24	0,161
Bilirrubina direta	0,03	0,03	0,03	0,04	0,969
Bilirrubina indireta	0,11	0,17	0,1	0,18	0,325

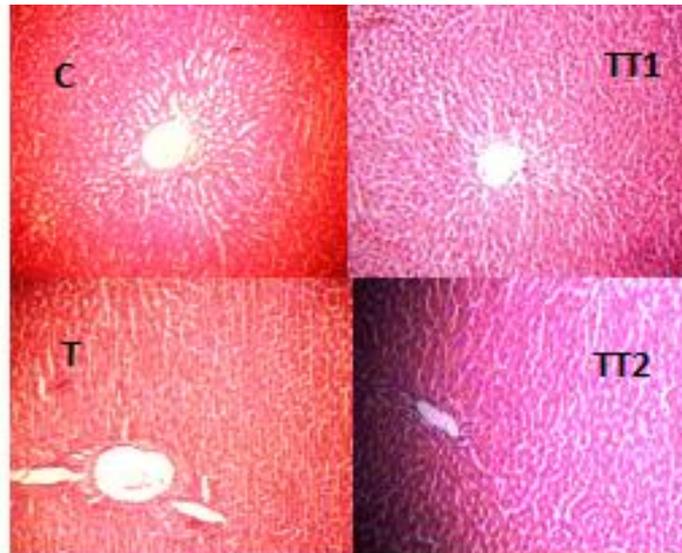
Os valores são apresentados como média; em virtude de a análise utilizada ser não paramétrica, não se dispôs de medidas de dispersão; os diferentes grupos de tratamento apresentaram valores similares entre si, considerando cada um dos parâmetros bioquímicos analisados ( $P > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

Grupo C, dieta comercial (n=8); Grupo T, dieta *termolizada* (autoclavada a 121,5°C, 30 min; n=7), Grupo TT<sub>1</sub>, dieta *termolizada* triturada acrescida de 6mg de tiamina/kg de dieta (n=7); Grupo TT<sub>2</sub>, dieta *termolizada* triturada acrescida de 120 mg de tiamina/kg de dieta (n=8). Fonte: autora desta dissertação, 2012.

### 3.3 Avaliação da análise histológica do fígado

Não foram observadas alterações macroscópicas do tecido hepático, a exemplo de esteatose, conforme verificado na figura 2, que exibe uma foto representativa do padrão hepático detectado nos animais de todos os grupos deste experimento, de um perfil

histológico normal. Foi observada a ausência de esteatose, fibrose e inflamação. Este resultado se compatibiliza com o do padrão bioquímico sérico normal, especificamente dos parâmetros de função e lesão hepática.



**Figura 2** Padrão histológico representativo do fígado dos ratos dos grupos de dieta Controle (C), *Termolizada* (T), *Termolizada* suplementada com tiamina nível 1 (6mg/kg de dieta, TT<sub>1</sub>) e *Termolizada* suplementada com tiamina nível 2 (120mg/kg de dieta, TT<sub>2</sub>). Não houve diferença no perfil histológico dos animais estudados. Fonte: autora desta dissertação, 2012.

#### 4 DISCUSSÃO

Estudos têm confirmado a formação aumentada de AGEs e a redução do teor da vitamina termolábil tiamina em alimentos fritos, assados e grelhados, devido às características de tempo e temperatura empregados nesses processamentos de alimentos, tal como preconizado na dieta *termolizada*, modelo experimental de ingestão de alto teor de AGEs (SHANGARI et al., 2007; URIBARRI et al., 2010). Para investigar o efeito da suplementação de tiamina, Shangari, Meth, O'brien (2007) realizaram um estudo experimental *in vitro*, no qual foi observado que a suplementação de tiamina protege os hepatócitos contra os efeitos citotóxicos das dicarbonilas reativas, glicoxal e metilglicoxal, geração de espécies reativas de oxigênio, subsequente formação aumentada de AGEs,

peroxidação lipídica e depleção da glutathiona (defesa antioxidante primária da célula) (SHANGARI; METH; O'BRIEN, 2007).

Uma única refeição rica em produtos de glicação avançada é capaz de aumentar os níveis circulantes pós-prandiais de AGEs e, de acordo com a cronicidade de sua ingestão, contribui para o aumento do *pool* corporal desses produtos de glicação (VLASSARA et al., 2002). A contribuição dos AGEs para condições biológicas envolvendo estresse oxidativo e inflamação, como aquelas associadas a doenças crônicas, incluem a modificação de componentes sanguíneos, como as lipoproteínas -fato que contribui para a hipercolesterolemia- e alterações hepáticas como observadas nas doenças hepáticas crônicas (HUEBSCHMANN et al., 2006; BASTA, 2011).

A ingestão crônica de dieta com níveis aumentados de AGEs e reduzidos de tiamina possibilitam o aumento dos níveis circulantes de produtos de glicação avançada, como resultado da redução da detoxificação hepática e do aumento da incorporação de alto teor de AGEs de origem dietética. Esse quadro caracterizaria, por exemplo, em tese, a situação particular do grupo tratado com a dieta *termolizada*.

Analisando-se os parâmetros relativos à qualidade das dietas e à manutenção do desenvolvimento dos animais, verifica-se que, embora tenha havido diferença de consumo intragrupo no decorrer do período experimental, não houve diferença significativa de consumo entre os grupos experimentais nem de eficiência alimentar das diferentes dietas, tendo sido detectada uma variação de peso com o decorrer do experimento, havendo aumento significativo da média de peso dos grupos nos últimos três meses de experimento quando comparados ao início do período experimental; e quando comparado os grupos que receberam tiamina complementarmente à dieta (pó) em relação aos grupos C e T (*pellet*), estes últimos grupos tiveram média ponderal maior que as médias dos grupos TT<sub>1</sub> e TT<sub>2</sub>; embora seja possível, não se pode atribuir esse resultado ao procedimento de adição da vitamina à dieta, nas condições do presente estudo. Parece que a idade exerceu influência na eficiência alimentar das dietas ofertadas, como percebido pela redução significativa das

médias do CEA do último mês de experimento comparando-as aos primeiros meses do período experimental, para três dos quatro grupos de animais.

Para a formação de AGEs durante a preparação de alimentos, além das condições de tempo e temperatura de processamento, o fator composição deve ser considerado. Desta forma, é possível inferir que algum aspecto da composição da dieta utilizada para termolização (dieta comercial) possa ter amenizado os efeitos potencialmente prejudiciais dos AGEs dietéticos, possibilitando os achados de padrão bioquímico sérico e histológico do fígado normais dos animais em envelhecimento. Shangari et al. (2007), em seu estudo, utilizaram a formulação AIN-93G como base para a dieta *termolizada*, fonte de AGEs, e avaliando sua repercussão no tecido intestinal, encontraram aumento da carga corporal de AGEs, de estresse oxidativo, de  $\alpha$ -aldeídos plasmáticos e de inflamação do cólon. Isso indica que tratamentos térmicos de alimentos, como a *termolização*, fornece condições para a formação aumentada de AGEs, sendo a dieta *termolizada* uma fonte exógena de estresse oxidativo e de AGEs (SHANGARI et al., 2007). Por outro lado, destaca-se a diferença de composição das dietas de base do presente estudo e da investigação realizada por Shangari et al. (2007), fator que pode ter contribuído para a diferença dos resultados encontrados. A composição em nutrientes da dieta pode interferir diretamente em alterações dos órgãos, tais como a infiltração de lipídeos no fígado. Outro estudo experimental retrata bem essa relação, quando os autores observaram o surgimento de esteatose hepática no grupo de animais que recebeu apenas dieta padrão AIN-93M, contendo o óleo de soja como fonte lipídica (BUENO et al., 2010). Que elementos na composição da dieta comercial podem ter contribuído para não se observar alterações hepáticas, após consumo de dieta *termolizada* por aproximadamente seis meses, representa uma questão para investigação posterior.

Esses dados da literatura científica e os achados deste experimento levam à interpretação de que as dietas *termolizadas*, administradas por um período crônico de 23 semanas, de acordo com o protocolo experimental, possivelmente devido à composição em nutrientes e em componentes antioxidantes e antiglicantes da dieta comercial utilizada (a

formulação comercial constitui-se de ingredientes naturais), pode ter amenizado os efeitos esperados do processo de termolização. A esse respeito, Goldberg et al. (2004) e Uribarri et al. (2010) apontam os alimentos fontes de proteínas e lipídeos, submetidos a calor seco, como os que contêm os maiores teores de AGEs (GOLDBERG et al., 2004; URIBARRI et al., 2010). No que se refere aos lipídeos, Goldberg et al. (2004) afirmam que a formação aumentada de AGEs nos alimentos ricos nesses nutrientes pode resultar da formação aumentada de radicais livres, durante reações de oxidação lipídica, os quais catalisam a formação de AGEs durante o tratamento térmico (GOLDBERG et al., 2004). Adicionalmente, a peroxidação lipídica pode formar glioxal, uma dicarbonila altamente reativa, que reage com o grupo  $\epsilon$ -amino do aminoácido lisina, formando, no alimento, o AGE mais importante biologicamente, a carboximetil lisina; sua ingestão pode aumentar significativamente os níveis de carboximetil lisina circulante, fornecendo condições para glicação e processo inflamatório no organismo (HULL et al., 2012).

No presente experimento a dieta utilizada contém soja e milho integrais como fonte principalmente de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Adicionalmente, a formulação foi enriquecida com ácido propiônico (1540 mg/Kg de dieta). Neste caso, por não ser possível precisar o perfil lipídico da dieta, cabe apenas a suposição de que a diversidade de composição dos ingredientes, quando comparada à utilização de óleo de soja, como fonte exclusiva de lipídios na AIN93, pode ter favorecido uma susceptibilidade diferente à oxidação lipídica durante o seu processamento, repercutindo possivelmente numa menor formação de AGEs. Adicionalmente, compostos bioativos resistentes ao tratamento térmico podem ter contribuído para o resultado encontrado. Esses elementos, em conjunto, podem ter concorrido para uma menor taxa de estresse oxidativo, de estresse carbonílico e de glicação, produzindo uma carga corporal de AGEs compatível com a capacidade de detoxificação do organismo, o que não promoveu alteração hepática em ratos *wistar* em envelhecimento, nas condições do presente protocolo.

## **5 CONCLUSÃO**

Em estudos previamente publicados na literatura, há evidências de que o tratamento térmico dos alimentos com calor seco leva à formação de AGEs e à perda do conteúdo do antiglicante tiamina. O consumo crônico de dieta *termolizada*, independentemente do consumo de tiamina, no presente estudo, não promoveu alterações bioquímicas séricas e histológicas hepáticas, em ratos *Wistar* em envelhecimento. Ainda que tenham sido estabelecidas as condições favoráveis à formação de AGEs e à diminuição de substâncias protetoras, através de tratamento térmico de elevada intensidade, o processo não foi suficiente para a promoção de alterações nos marcadores estudados. A composição da dieta pode ter determinado os resultados encontrados, uma vez que a presença de compostos susceptíveis à glicação ou aqueles antiglicantes influenciam a concentração de produtos de glicação gerados. Estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer os mecanismos pelos quais a ingestão crônica de dieta *termolizada*, com ou sem adição de tiamina, não promoveu alterações histológicas hepáticas e bioquímicas séricas no modelo utilizado.

## REFERÊNCIAS

1. Babaei-Jadidi, R. ; Karachalias, N. ; Kupich, C. ; Ahmed, N. ; Thornalley, P. J. High-dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia**, n. 47, p. 2235–2246, 2004.
2. Basta, G.; Navarra, T.; Simone, P. D.; Turco, S. D.; Gastaldelli, A.; Filipponi, F. What Is the Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products–Ligand Axis in Liver Injury? **Liver Transplantation**, n. 17, p. 633-640, 2011.
3. Beránek, M.; Dršata, J.; Palička, V. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 218, p. 35–39, 2001.
4. Bueno, N. B.; Silva, M. A. F.; Melo, I. S. V.; Ataíde, T. R.; Oliveira, S. L.; Sant’Ana, A. E. G. 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. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 6, p. 584-587, 2010.
5. Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Nègre-Salvayre, A.; Salvayre, R.; Dousset, N.; Curatola, G. Structural modifications of HDL and functional consequences. **Atherosclerosis**, n. 184, p. 1-7, 2006.

6. Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B.S.; Uribarri, J. et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.
7. Gujarati, D. N. **Econometria Básica**. 4. ed. São Paulo: Editora Campus, 2006, 819p.
8. Hansen, B.; Svistounov, D.; Olsen, R.; Nagai, R.; Horiuchi, S.; Smedsrød, B. Advanced glycation end products impair the scavenger function of rat hepatic sinusoidal endothelial cells. **Diabetologia**, n. 45, p. 1379–1388, 2002.
9. Hilmer, S. N.; Cogger, V. C.; Couteur, D. G. L. Basal Activity of Kupffer Cells Increases With Old Age. **Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 62A, n. 9, p. 973–978, 2007.
10. Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H.; Reusch, J. E. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420-32, 2006.
11. Hull, G. L. J.; Woodside, J. V.; Ames, J. M.; Cuskelly, G. J. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. **Food Chemistry**, n. 131, p. 170-174, 2012.
12. Hyogo, H.; Yamagishi, S. Advanced Glycation End Products (AGEs) and their Involvement in Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design**, n. 14, p. 969-972, 2008.
13. Isoda, K.; Folco, E.; Marwali, M. R.; Ohsuzu, F.; Libby, P. Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis. **Atherosclerosis**, n. 198, p. 307-312, 2008.
14. Reeves, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet. **J. Nutr**, n. 127, p. 838S-841S, 1997.
15. Shangari, N.; Depeint, F.; Furrer, R.; Bruce, W. R.; Popovic, M.; Zheng, F.; et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma  $\alpha$ -aldehydes and colonic inflammation em the rat. **Chemico-Biological Interactions**, n. 169, p. 100-109, 2007.
16. Shangari, N.; Mehta, R.; Brien, P. J. O. Hepatocyte susceptibility to glyoxal is dependent on cell thiamin content. **Chemico-Biological Interactions**, n.165, p. 146-154, 2007.
17. Tiniakos, D. G.; Vos, M. B.; Brunt, E. M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, n. 5, p. 145-171, 2010.
18. Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Pratical guide to Their Reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**, n. 110, p. 911-916, 2010.
19. Vasdev, S.; Gill, V.; Singal, P. Role of Advanced Glycation End Products in Hypertension and Atherosclerosis: Therapeutic Implications. **Cell Biochem Biophys**, n. 49, p. 48–63, 2007.
20. Vlassara, H.; Cai, W.; Crandall, J.; Goldberg, T.; Oberstein, R.; Dardaine, V. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 24, p. 15596-15601, 2002.
21. Yilmaz, Y.; Ulukaya, E.; Oz Gul, O.; Arabul, M.; Gul, C. B.; Atug, O.; et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 802–807, 2009.

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os produtos de glicação avançada, os denominados AGEs, são gerados no organismo humano, por processos não enzimáticos, promovendo danos tanto no ambiente celular como extracelular, mas também, por reações de natureza semelhante, são formados nos alimentos submetidos ao processamento, especialmente em condições de elevada temperatura e baixa umidade. O *pool* corporal é determinado pelo conjunto desses fenômenos. O organismo possui mecanismos de detoxificação para os produtos de glicação avançada. Entretanto, em condições de estresse carbonílico e oxidativo, proporcionadas, por exemplo, pelo consumo crônico de dieta com alto teor destes compostos, ou mesmo em condições fisiológicas especiais, como o envelhecimento, os AGEs saturam estes mecanismos de defesa do organismo, podendo haver perda da capacidade em degradá-los. Assim, os AGEs produzidos no organismo e os dietéticos, através do aumento do seu *pool* corporal, agem no processo das doenças crônicas, em particular aquelas que acometem o tecido hepático (HANSEN et al., 2002; HUEBSCHMANN et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010; URIBARRI et al., 2010).

Neste sentido, compostos antiglicantes, naturalmente encontrados em alimentos, são alvo de pesquisas a fim de se minimizar os efeitos da carga excessiva de AGEs sobre o organismo, condição especialmente associada ao consumo da dieta ocidental típica. Em contexto experimental, a tiamina, vitamina hidrossolúvel, termolábil e essencial para seres humanos, exerceu efeito protetor sobre os hepatócitos, contra as espécies reativas de oxigênio, as dicarbonilas reativas e os próprios AGEs (SHANGARI; MEHT; O'BRIEN, 2007). Considera-se, inclusive, que mais do que a formação de AGEs, a destruição de elementos protetores, como a tiamina, pelo processamento de alimentos se associaria aos danos promovidos pela dieta *termolizada*, modelo experimental de elevado teor de AGEs dietéticos (SHANGARI et al., 2007). No presente estudo, pretendeu-se analisar o impacto do consumo crônico de uma dieta *termolizada*, associada a diferentes níveis de tiamina, em aspectos morfo-funcionais do tecido hepático de ratos adultos. Não foram detectadas alterações histológicas e em marcadores séricos funcionais do tecido, mesmo após aproximadamente seis meses de consumo de dieta *termolizada*, independente da dose de tiamina

administrada. Em vista das evidências, é viável a hipótese de que a composição da dieta de base utilizada, em nutrientes e/ou antioxidantes e antiglicantes, possa ter concorrido para os resultados encontrados.

Em perspectivas futuras, estudos adicionais são necessários para consolidar o conhecimento acerca da repercussão metabólica dos AGEs sobre o fígado, determinar os níveis de ingestão compatíveis com a capacidade de detoxificação do organismo, e investigar compostos naturais com ação antiglicante, que sejam ingeridos preferencialmente na forma natural ou, ainda, de suplementos alimentares, são caminhos promissores para o controle dos efeitos deletérios dos produtos de glicação, aos quais especialmente a população ocidental está exposta, promovendo a prevenção de doenças e o aumento da expectativa de vida saudável.

**5 REFERÊNCIAS**

1. Ahmed, N.; Thornalley, P. J.; Lüthen, R.; Häussinger, D.; Sebekova, K.; Schinzel, R. et al. Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. **Journal of Hepatology**, n. 41, p. 913–919, 2004.
2. Ansari, N. A.; Rasheed, Z. Non-Enzymatic Glycation of Proteins: From Diabetes to Cancer. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 335-342, 2009.
3. Barbosa, J. H. P.; Oliveira, S. L.; Seara, L. T. Produtos da glicação avançada (AGEs) dietéticos e as complicações do diabetes. **Rev Nutr**, v. 22, n. 1, p. 113-124, 2009.
4. Basta, G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basics mechanisms to clinical implications. **Atherosclerosis**, n. 196, p. 9-21, 2008.
5. Basta, G.; Navarra, T.; Simone, P. D.; Turco, S. D.; Gastaldelli, A.; Filipponi, F. What Is the Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products–Ligand Axis in Liver Injury? **Liver Transplantation**, n. 17, p. 633-640, 2011.
6. Beránek, M.; Dršata, J.; Palička, V. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, n. 218, p. 35-39, 2001.
7. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 13, p. 813-820, 2001.
8. Butscheid, M.; Hauptvogel, P.; Fritz, P.; Klotz, U.; Alschner, D. M. Hepatic expression of galectin-3 and receptor for advanced glycation end products in patients with liver disease. **J Clin Pathol**, n. 60, p. 415-418, 2007.
9. Carvalheira, J. B. C.; Saad, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 360-367, 2006.
10. D'Adamo, E.; Giannini, C.; Chiavaroli, V.; Giorgis, T.; Verrotti, A.; Chiarelli, F.; et al. What Is the Significance of Soluble and Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products in Liver Steatosis in Obese Prepubertal Children? **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 14, n. 6, p. 1167-1172, 2011.
11. Delgado-Andrade, C.; Tessier, F. J.; Niquet-Leridon, C.; Seiquer, I.; Navarro, M. P. Study of the urinary and faecal excretion of Nε-carboxymethyllysine in young human volunteers. **Amino Acids**, 2011, Doi 10.1007/s00726-011-1107-8.
12. Förster, A.; Kühne, Y.; Henle, T. Studies on the absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. **Ann N Y Acad Sci**, n. 1043, p. 474–81, 2005.
13. Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B. S.; Uribarri, J. et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.
14. Guimarães, E. L. M.; Empsen, C.; Geerts, A.; Grunsven, L. A. V. Advanced glycation end products induce production of reactive oxygen species via the activation of NADPH oxidase in murine hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 52, p. 389–397, 2010.

15. Hansen, B.; Svistounov, D.; Olsen, R.; Nagai, R.; Horiuchi, S.; Smedsrød, B. Advanced glycation end products impair the scavenger function of rat hepatic sinusoidal endothelial cells. **Diabetologia**, n. 45, p. 1379–1388, 2002.
16. Horiuchi, S. The liver is the main site for metabolism of circulating advanced glycation end products. **Journal of Hepatology**, n. 36, p. 123–125, 2002.
17. Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H.; Reusch, J. E. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420–32, 2006.
18. Hyogo, H.; Yamagishi, S. Advanced Glycation End Products (AGEs) and their Involvement in Liver Disease. **Current Pharmaceutical Design**, n. 14, p. 969–972, 2008.
19. Iwamoto, K.; Kanno, K.; Hyogo, H.; Yamagishi, S.; Takeuchi, M.; Tazuma, S.; et al. Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. **J Gastroenterol**, n. 43, p. 298–304, 2008.
20. Koschinsky, T.; He, C.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Buenting, C. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6476–9, 1997.
21. Kuhla, A.; Trieglaff, C.; Vollmar, B. Role of age and uncoupling protein-2 in oxidative stress, RAGE/AGE interaction and inflammatory liver injury. **Experimental Gerontology**, (2011), doi: 10.1016/j.exger.2011.07.008.
22. Matsumoto, K.; Sano, H.; Nagai, R.; Suzuki, H.; Kodama, T.; Yoshida, M. Endocytic uptake of advanced glycation end products by mouse liver sinusoidal endothelial cells is mediated by a scavenger receptor distinct from the macrophage scavenger receptor class A. **Biochem J**, n. 352, p. 233–240, 2000.
23. Monnier, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys**, v. 419, n. 1, p. 1–15, 2003.
24. Naudí, A.; Jové, M.; Ayala, V.; Portero-Otín, M.; Pamplona, R. Glicación de proteínas mitocondriales, estrés oxidativo y envejecimiento. **Rev Esp Geriatr Gerontol**, v. 45, n. 3, p. 156–166, 2010.
25. Neeper, M.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wang, F.; Pan, Y. C. et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem**, n. 267, p. 14998–15004, 1992.
26. Negre-Salvayre, A.; Salvayre, R.; Auge´, N.; Pamplona, R.; Portero-Otín, M. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, 2009.
27. Peppas, M.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced glycoxidation a new risk factor for cardiovascular disease? **Cardiovascular Toxicology**, n. 2, p. 275–287, 2002.
28. Ramasamy, R.; Vannucci, S. J.; Yan, S. S. D.; Herold, K.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, v. 15, n. 7, p. 16R–28R, 2005.

29. Schlueter, C.; Hauke, S.; Flohr, A. M.; Rogalla, P.; Bullerdiek, J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms—a result of regulated alternative splicing? **Biochim Biophys Acta**, n. 1630, p. 1-6, 2003.
30. Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Stern, D. M. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Biochim Biophys Acta**, n. 1498, p. 99-111, 2000.
31. Sebekova, K.; Kupcova, V.; Schinzel, R.; Heidland, A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis—amelioration by liver transplantation. **J Hepatol**, n. 36, p. 66-71, 2002.
32. Semba, R. D.; Nicklett, E. J.; Ferrucci, L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 65A, n. 9, p. 963–75, 2010.
33. Shangari, N.; Depeint, F.; Furrer, R.; Bruce, W. R.; Popovic, M.; Zheng, F.; et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma  $\alpha$ -aldehydes and colonic inflammation em the rat. **Chemico-Biological Interactions**, n. 169, p. 100-109, 2007.
34. Shangari, N.; Mehta, R.; Brien, P. J. O. Hepatocyte susceptibility to glyoxal is dependent on cell thiamin content. **Chemico-Biological Interactions**, n.165, p. 146-154, 2007.
35. Tessier, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathologie Biologie**, n. 58, p. 214-219, 2010.
36. Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. **Drug Metabol Drug Interact**, v. 23, n. 1-2, p. 125–150, 2008.
37. Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Pratical guide to Their Reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**, n. 110, p. 911-916, 2010.
38. Vlassara, H.; Cai, W.; Crandall, J.; Goldberg, T.; Oberstein, R.; Dardaine, V. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, n. 24, p. 15596-15601, 2002.
39. Vlassara, H.; Palace, M. R. Glycooxidation: The menace of diabetes and aging. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 70, n. 4, p. 232-241, 2003.
40. Yagmur, E.; Tacke, F.; Weiss, C.; Lahme, B.; Manns, M. P.; Kiefer, P. et al. Elevation of Ne-(carboxymethyl)lysine-modified advanced glycation end products in chronic liver disease is an indicator of liver cirrhosis. **Clin Biochem**, n. 39, p. 39-45, 2006.
41. Yilmaz, Y.; Ulukaya, E.; Oz Gul, O.; Arabul, M.; Gul, C. B.; Atug, O.; et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 802–807, 2009.
42. Yonekura, H.; Yamamoto, Y.; Sakurai, S.; Petrova, R. G.; Abedin, M. J.; Li, H. et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and

their putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem J**, n. 370, p. 1097-1109, 2003.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 22/04/2009

Senhor (a) Pesquisador (a), Suzana Lima de Oliveira  
Luci Tojal e Seara  
Terezinha da Rocha Ataíde  
Junia Helena Porto Barbosa

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 22/04/2009 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 003705/2009-76 sob o título **Repercussões Metabólicas Hepáticas de AGEs diabéticos em ratos adultos**, de sua autoria, vem por meio deste instrumento comunicar sua aprovação, CEP, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.c).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

(\*) Áreas temáticas especiais

Prof. Dr. Walter Matias Lima  
ordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa

