

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO**

**FABYAN ESBERARD DE LIMA BELTRÃO**

**ALOPURINOL NA PREVENÇÃO DA ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA E  
HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR DIETA RICA EM FRUTOSE EM RATOS  
WISTAR**

**João Pessoa**

**2012**

**FABYAN ESBERARD DE LIMA BELTRÃO**

**ALOPURINOL NA PREVENÇÃO DA ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA E  
HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR DIETA RICA EM FRUTOSE EM RATOS  
WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

**ORIENTADOR:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria José de Carvalho Costa

**COORIENTADOR:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosália Gouveia Filizola

**João Pessoa**

**2012**

**FABYAN ESBERARD DE LIMA BELTRÃO**

**ALOPURINOL NA PREVENÇÃO DA ESTEATO-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA E  
HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR DIETA RICA EM FRUTOSE EM RATOS  
WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria José de Carvalho Costa

**Orientadora titular**

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosália Gouveia Filizola

**Coorientadora – Titular**

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

**Membro interno – Titular**

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

---

Prof. José Eymard Moraes de Medeiros Filho

**Membro externo – Titular**

(UFPB/ Centro de Ciências Médica/Departamento de Medicina)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristianne da Silva Alexandre

**Membro externo – Suplente**

(UFPB/ Centro de Ciências Médica/Departamento de Medicina)

**João Pessoa  
2012**

Dedico este trabalho a **Deus**, conhecimento supremo, a minha grande família, em especial as duas mulheres da minha vida, a minha mãe **Euda** e a minha esposa **Daniele**, a minha orientadora, **Dr<sup>a</sup> Maria José** e a todos os meus amigos que indiretamente me ajudaram nesta conquista.

## AGRADECIMENTOS

Ao nosso grande Pai, Deus, por sua fonte inesgotável de amor e sabedoria e por sempre estar presente na minha vida.

A minha amada mãe Euda, primeira professora, que me ensinou a ser humilde e paciente e todas as orações ao longo dos anos.

Ao meu pai Napoleão, meu grande exemplo de vida e incentivo à minha formação.

A minha amada esposa Daniele, companheira de todas as horas, pelo incentivo, dedicação e compreensão.

Aos meus irmãos, Fabricia, Fabyo e Fabyanna, por todo incentivo e inspiração.

Aos meus filhos, Giulia, Gabriel e Pedro, razão do meu viver.

A minha sogra Edna, por me receber como um filho e também pelas orações dedicadas.

A minha orientadora Dra. Maria José de Carvalho Costa, exemplo de pesquisadora, pela confiança, atenção, determinação e ensinamentos.

A minha co-orientadora, Dra. Rosália Gouveia Filizola, exemplo de profissional dedicada à endocrinologia, pela atenção, presteza e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Jose Eymard Moraes de Medeiros Filho, meu primeiro incentivador nesse projeto de pesquisa e um grande exemplo de médico e orientador, o qual admiro muito.

A Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, minha primeira incentivadora do mestrado em nutrição, pela confiança e orientação.

A José Crispim e Josué Ramalho, amizade iniciada no LTF/UFPB que me ensinaram a manusear e respeitar os animais de laboratório.

A todos os colegas da turma de mestrado de nutrição (2010) pela acolhida e companheirismo.

Aos meus grandes amigos, Agostinho, Edivaldo, Eduardo, Felipe, Gerônimo, Igor e Lauro, pela paciência, incentivo e ensinamentos.

A minha amiga Cristianne Alexandre, minha orientadora na área da nefrologia, pelos ensinamentos e determinação em tudo que faz.

Aos alunos da graduação, Luciana e Thyago, pela dedicação e empenho ao projeto.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

Nas últimas duas décadas a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem sido reconhecida como a doença hepática crônica mais comum nos países ocidentais, em paralelo com a epidemia de obesidade e consumo de dieta com alto teor de frutose. Pesquisadores sugerem que DHGNA possa ser a manifestação hepática da síndrome metabólica. Apesar da EHNA e hiperuricemia estarem fortemente relacionadas com a síndrome metabólica, poucos cientistas na literatura consultada associaram as duas patologias. Alopurinol, um potente inibidor da xantina-oxidase, com efeito anti-inflamatório e antioxidante tem sido utilizado para prevenir a síndrome metabólica induzida por frutose. Assim, o objetivo principal do presente estudo é avaliar os efeitos do alopurinol na prevenção da esteatose hepática não alcoólica (EHNA) e hiperglicemia em ratos alimentados com água rica em frutose. Ratos Wistar foram alimentados com 20% de frutose na água de beber, com ou sem alopurinol (30mg/kg/dia) durante 14 semanas. Um grupo controle recebeu uma dieta normal. Níveis de colesterol total ( $P < 0,001$ ) e glicose ( $P < 0,05$ ) no grupo de frutose e de triglicérides ( $P < 0,01$ ) e creatinina ( $P < 0,01$ ) no grupo alopurinol foram significativamente mais elevados, em comparação com o controle normal. As correlações significativas encontradas foram ácido úrico com glicose ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,001$ ) e creatinina com triglicérides ( $r = 0,354$ ,  $p < 0,05$ ). A análise histopatológica hepática do grupo frutose mostrou esteatose, necroinflamação e fibrose de leve a moderada. O tratamento com alopurinol diminuiu esteatose macrovesicular (27%,  $P < 0,01$ ), necroinflamação (72%,  $P < 0,001$ ) e fibrose (26%,  $P < 0,05$ ) em hepatócitos. A terapia com alopurinol evitou significativamente a hiperglicemia e aumentou os níveis de HDL colesterol nos ratos e foi eficaz na prevenção da necroinflamação e fibrose hepática induzida por frutose. Corresponde assim ao primeiro estudo a provar a ação de um inibidor da xantina oxidase como um tratamento para EHNA.

**Palavras-chave:** Esteatohepatite não alcoólica, Hiperglicemia, Alopurinol, Frutose, Ratos Wistar.

## ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the last two decades has been recognized as the most common chronic liver disease in Western countries, paralleling the epidemic of obesity and consumption of high-fructose diet. Researchers suggest that NAFLD may be the hepatic manifestation of metabolic syndrome. Although NAFLD and hyperuricemia are strongly related to metabolic syndrome, few scientists in the literature associated with both diseases. Allopurinol, a potent inhibitor of xanthine oxidase, with anti-inflammatory and antioxidant effects has been shown to prevent the metabolic syndrome induced by fructose. Thus, the main objective of the study is to evaluate the effects of allopurinol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hyperglycemia in rats fed high-fructose water. Wistar rats were fed along with 20% fructose in drinking water with or without allopurinol (30mg/kg/day) for 14 weeks. A control group received a normal diet. Serum total cholesterol level ( $P<0,001$ ) and glucose ( $P<0,05$ ) in fructose group and of triglycerides ( $P<0,01$ ) and creatinine ( $P<0,01$ ) in allopurinol group were significantly increased compared to normal control. Significant correlations were found glucose with uric acid ( $r = 0.51, p <0.001$ ) and creatinine with triglycerides ( $r = 0.354, p <0.05$ ). Liver histopathology from fructose group showed mild to moderate, steatosis, necroinflammation and fibrosis. Allopurinol treatment decreases macrovesicular steatosis (27%,  $P<0,01$ ), necroinflammation (72%,  $P<0,001$ ) and fibrosis (26%,  $P<0,05$ ) in hepatocytes. Therapy with allopurinol significantly prevented hyperglycemia and increased HDL cholesterol levels in rats and was effective in preventing necroinflammation and fructose-induced hepatic fibrosis. This is the first study to prove the action of a xanthine oxidase inhibitor as a treatment for NASH.

**Keywords:** Nonalcoholic steatohepatitis, Hyperglycemia, Allopurinol, Fructose, Wistar rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1</b> Ação da metformina em diferentes sistemas.....	27
<b>Figura 2</b> Os potenciais efeitos fisiopatológicos de terapias que estão sob investigação.....	32
<b>Figura 3</b> Vias metabólicas da frutose e inter-relação com as vias metabólicas dos glicídios e lipídeos.....	36
<b>Figura 4</b> Distribuição do consumo de frutose entre os grupos e subgrupos de alimentos em adultos (Idade superior a 19 anos).....	38
<b>Figura 5</b> Distribuição do consumo de frutose entre os grupos e subgrupos de alimentos em adolescentes (Idade entre 12 – 18 anos).....	38
<b>Figura 6</b> Os potenciais efeitos fisiopatológicos do alopurinol na EHNA.....	44

### FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figura 1</b> Correlação entre as variáveis.....	71
<b>Figura 2</b> Vias metabólicas e inflamatórias inibidas pelo alopurinol.....	75

### FIGURAS DE OUTROS RESULTADOS ENCONTRADOS

<b>Figura 1</b> Mortalidade entre os grupos.....	84
--	----

## LISTA DE TABELAS

### TABELAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Tabela 1</b> Gradação e estadiamento das lesões histopatológicas da EHNA.....	21
<b>Tabela 2</b> Drogas com efeitos anti-oxidantes e hepatoprotetoras.....	33
<b>Tabela 3</b> Drogas sensibilizadores da insulina, redutores do peso e hipolipemiantes.....	34

### TABELAS DO ARTIGO

<b>Tabela 1</b> Relação entre ganho de peso final e biometria do fígado dos grupos.....	70
<b>Tabela 2</b> Variáveis bioquímicas e hematológicas dos grupos.....	71
<b>Tabela 3</b> Análise histológica do fígado dos grupos experimentais.....	72

### TABELAS DE OUTROS RESULTADOS ENCONTRADOS

<b>Tabela 1</b> Relação entre consumo de água e ração e diurese dos grupos.....	84
<b>Tabela 2</b> Outros parâmetros bioquímicos avaliados dos grupos.....	84

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AEP** - Ácido Eicosapentaenóico
- AGL** – Ácidos Graxos Livres
- AGMI** - Ácidos Graxos Monoinsaturados
- AGPI  $\omega$ -3** - Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3
- ALT** – Alanina Transaminase
- AUDC** - Ácido Ursodesoxicólico
- BRA** – Bloqueador dos Receptores da Angiotensina
- CCS** – Centro de Ciências da Saúde
- DHGNA** - Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
- DM2** – Diabetes Melitus tipo 2
- EHNA** - Esteato-Hepatite Não Alcoólica
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio
- FNT** – Fator de Necrose Tumoral
- FTC- $\beta$**  - Fator de Transformação do Crescimento  $\beta$
- GLUT** – Glucose Transport
- HOMA-IR** - Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance
- IMC** - Índice de Massa Corporal
- LHS** – Lípase Hormônio Sensível
- LLP** –Lípase Lipoprotéica
- LTF** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
- NHANES III** - Third National Health and Nutrition Examination Survey
- PPAR- $\gamma$**  - Peroxisome Proliferator Activated Receptors do tipo  $\gamma$
- PTX** - Pentoxifilina
- RI** - Resistência insulínica
- RLO** – Radicais Livre de Oxigênio
- SREBP** - Sterol Regulatory Element-Binding Proteins
- UFPB** - Universidade Federal da Paraíba
- WHO** - World Health Organization
- XO** – Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Esteato-hepatite não alcoólica.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Definição e prevalência.....	16
2.1.2 Fisiopatologia.....	17
2.1.3 Diagnóstico.....	19
2.1.3.1 Quadro clínico e diagnóstico laboratorial.....	19
2.1.3.2 Diagnóstico por métodos de imagem.....	20
2.1.3.3 Diagnóstico histológico .....	20
2.1.4 Tratamento.....	22
2.1.4.1 Exercícios e dieta.....	22
2.1.4.2 Suplementação vitamínica e efeito anti-oxidantes.....	24
2.1.4.3 Drogas.....	26
2.1.4.3.1 Drogas sensibilizadores da insulina e redutores do peso.....	26
2.1.4.3.2 Drogas hepatoprotetoras.....	29
2.1.4.3.3 Drogas hipolipemiantes.....	30
<b>2.2 Dieta rica em frutose associado à síndrome metabólica, hiperuricemia e esteato-hepatite não alcoólica.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Hiperuricemia e esteato-hepatite não alcoólica.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Alopurinol e esteato-hepatite não alcoólica.....</b>	<b>42</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Dieta e drogas.....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Procedimento experimental.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5 Coleta dos materiais e morte dos animais.....</b>	<b>46</b>
<b>3.6 Análise histológica.....</b>	<b>47</b>
<b>3.7 Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>63</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>64</b>
<b>OUTROS RESULTADOS ENCONTRADOS.....</b>	<b>83</b>

## INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição clínico-patológica caracterizada por um largo espectro de dano hepático, que varia de simples esteatose a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), fibrose avançada e cirrose. Nas últimas duas décadas, a DHGNA vem sendo reconhecida como a doença hepática mais comum nos países ocidentais e a prevalência na população geral é estimada em 20% a 30% (BEDOGNI et al., 2005).

Existe uma forte associação da DHGNA com os componentes da chamada síndrome metabólica (intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, HDL-colesterol baixo, obesidade central, hipertensão arterial e hipeuricemia), o que sugere que a DHGNA possa ser a manifestação hepática da síndrome metabólica (MARCHESINI et al., 1999). O modelo original da patogênese de EHNA, proposto por Day e James (1998) considera essa doença como o resultado de dois tipos de insulto: o primeiro é o desenvolvimento da esteatose hepática induzida pelo estresse oxidativo, aumentando a predisposição a um segundo insulto o qual mediado por citocinas, leva à lesão hepatocitária, inflamação e fibrose. Nesse contexto a resistência à insulina e a resistência à leptina (hormônio produzido pelas células adiposas com efeito anti-inflamatório) correspondem aos principais promotores do estresse oxidativo e fibrogênese no fígado.

As elevações nos níveis séricos de ácido úrico estão associados com a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, sendo a hiperuricemia é um achado prevalente em pacientes com síndrome metabólica, dessa forma, a hipeuricemia, dita como um dos principais componentes da síndrome metabólica (PERLSTEIN et al., 2006), embora seu significado clínico ainda é controverso e muitas vezes subestimado, estudos recentes em animais, têm chamado a atenção para outra perspectiva sobre a hipeuricemia, indicando que ela pode não ser apenas uma consequência de estados de resistência à insulina, mas também um preditor significativo do desenvolvimento da síndrome metabólica. (NAKAGAWA et al., 2005; PEREZ-POZO et al., 2010).

Vários pesquisadores com trabalhos em animais e humanos têm sugerido que o excessivo consumo de frutose poderia contribuir para o aumento da prevalência da síndrome metabólica e seus componentes, incluindo a hipertrigliceridemia, HDL-colesterol baixo, obesidade, hipertensão arterial, hiperglicemia e hiperuricemia (HWANG et al., 1987; DAI; MCNEILL, 1995; BEZERRA et al., 2001; ELLIOT et al., 2002; NAKAGAWA et al., 2005).

A mais forte evidência dos efeitos da hiperuricemia no desenvolvimento da síndrome metabólica foi através de estudos em modelos animais, nos quais medicações com mecanismos de diminuir os níveis de ácido úrico puderam prevenir ou reverter a resistência à insulina e os outros fatores metabólicos associados à síndrome metabólica (NAKAGAWA et al., 2005).

Esteato hepatite não alcoólica (EHNA) e hiperuricemia estão fortemente relacionados com a síndrome metabólica, entretanto poucos estudos epidemiológicos relacionam a DHGNA com aumento sérico do ácido úrico. Pesquisadores, em estudos recentes, vêm utilizando dieta rica em frutose em ratos para induzir hiperuricemia e DHGNA e com distribuição de gordura hepática mais semelhante a humanos, comparadas à dieta rica em gordura (KAWASAKI et al., 2009).

Terapias específicas para a DHGNA, não há grandes estudos publicados que sirvam de base para recomendações terapêuticas definitivas. Dessa forma, o tratamento visa apenas controlar os fatores predisponentes associados com a síndrome metabólica. Formas alternativas de tratamento para os pacientes com DHGNA vêm sendo investigadas e envolvem diminuição do estresse oxidativo, como anti-oxidantes como N-acetilcisteína, betaína e vitamina E.

A hiperuricemia resultante da hiperestimulação da xantina-oxidase promovida pela resistência à insulina e leptina gera estresse oxidativo no fígado por hiperprodução de radicais livres e conseqüentemente pode promover dano hepático (WIEZOREK et al., 1994; MARTINEZ-HERVAS et al., 2009). Na literatura consultada, não se encontrou artigo utilizando o alopurinol especificamente no tratamento da EHNA.

Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo é avaliar os efeitos do alopurinol na prevenção da esteato-hepatite não alcoólica e hiperglicemia induzida por dieta em frutose em ratos Wistar.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Esteato-hepatite não alcoólica

#### 2.1.1 Definição e prevalência

Em 1980, Ludwig et al. utilizaram o termo esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) para caracterizar uma situação de mulheres obesas e diabéticas com esteatose hepática macrovesicular na ausência de consumo etílico em níveis considerados hepatotóxicos. A DHGNA é uma condição clínico-patológica caracterizada por um largo espectro de lesão hepática que varia de esteatose macrovesicular simples à esteatohepatite, fibrose avançada e cirrose (SHETH et al., 1997; ANGULO, 2002; SASS et al., 2005). A EHNA é considerada a forma de maior importância clínica e maior gravidade da DHGNA, por estar associada com fibrose hepática progressiva.

Powell et al., (1990) após avaliação clínico e histopatológica de 42 pacientes com EHNA por 4,5 anos propuseram os seguintes critérios diagnósticos para a EHNA:

- 1) Biópsia hepática com degeneração gorda e inflamação, com ou sem corpos hialinos de Mallory, fibrose ou cirrose;
- 2) Evidência de baixo consumo de álcool (inferior a 40 g/semana);
- 3) Ausência de outras causas de hepatite (virus, auto-ímmunes e outras)

Dois tipos de EHNA são descritas: EHNA primária (que esta associada à síndrome metabólica e seus fatores determinantes como obesidade, diabetes tipo 2 e hiperlipidemia) e EHNA secundária após cirurgia bariátrica, rápida perda de peso na obesidade, nutrição parenteral, tratamento com drogas, lipodistrofias ou doença de Wilson (MEDINA et al., 2004).

A prevalência mundial de DHGNA não foi ainda determinada, mas estima-se que seja de 10-24% em várias populações, afetando todos os grupos raciais e étnicos, sem predileção por sexo ou idade e nos países ocidentais é a doença hepática mais comum (SASS et al.,1997). A DHGNA apresenta uma distribuição mundial e com importantes variações geográficas, com maior ocorrência em países onde a obesidade é mais prevalente. Nos Estados Unidos, a DHGNA corresponde a principal causa de aumento dos níveis persistentes das aminotransferases.

### 2.1.2 Fisiopatologia

A patogênese da EHNA é pouco esclarecida e a sua evolução para cirrose é multifatorial. Day e James em 1998 propuseram um modelo original para a patogênese da EHNA, ao considerar essa doença como o resultado de dois tipos de insulto:

1º insulto – Desenvolvimento de esteatose microvesicular ou mista decorrente de uma alteração aguda da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos induzida por estresse oxidativo, promovendo lesão mitocondrial e aumentando a predisposição do fígado a um segundo insulto;

2º insulto - Dano hepático (hepatite e cirrose hepática) mediado por citocinas (Fator de necrose tumoral (FNT)  $\alpha$  e  $\beta$ , interleucina 8, entre outros) e radicais livre de oxigênio (RLO), resultantes do estresse oxidativo.

A condição mais frequentemente associada à EHNA é a obesidade, presente em 69 a 100% dos casos (SHETH et al.,1997) e estima-se que 75% dos pacientes com diabetes tipo 2 apresentem alguma forma de EHNA (MEDINA et al., 2004). A resistência à insulina (RI) é o principal fator patogênico da EHNA (MARCHESINI et al.,2001) e se manifesta por hiperinsulinemia e aumento da produção de glicose hepática. Altos níveis circulantes de insulina decorrente da RI aumentam a atividade da lipase hormônio sensível (LHS) nos adipócitos resultando em elevação nas taxas de triglicerídeos e aumento do fluxo de ácidos graxos livres para o fígado.

Vários estudiosos relataram que a RI está presente na maioria dos pacientes com DHGNA, independente da coexistência da obesidade (MARCHESINI et al.,2001; BROWNING; HORTON,2004), sugerindo que DHGNA/EHNA pode ser a manifestação hepática da síndrome metabólica (MARCHESINI et al.,1999). Esses pesquisadores também demonstraram que a hiperinsulinemia na DHGNA não é resultante da alteração da extração hepática de insulina (MARCHESINI et al.,2003), que o grau de obesidade prediz o risco de doença hepática avançada e que a presença de diabetes mellitus tipo 2 ou de resistência à insulina parecem ser preditores independentes de EHNA ou fibrose (CHITTURI et al., 2002; PAGANO et al., 2002).

O aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) do tecido adiposo, provavelmente devido ao aumento da sua liberação da massa adiposa com a supressão da ação anti-lipolítica da insulina é o fator primordial na relação entre obesidade, RI e o risco para EHNA. Marchesini et al.(2001) demonstraram em pacientes com EHNA um aumento da concentração basal de AGL e redução da supressão da lipólise mediada pela insulina quando comparados com controle. Outros pesquisadores também demonstraram que o risco de EHNA

parece estar particularmente associado à obesidade central ao invés de periférica (MARCHESINI et al.,2001; CHITTURI et al.,2002). Os adipócitos viscerais são mais susceptíveis à lipólise que os da periferia e os AGL liberados dos sítios de gordura centrais são drenados diretamente para o fígado através da veia porta.

O mecanismo da RI associada com a obesidade parece estar ligado com a expressão do mRNA FNT- $\alpha$  no tecido adiposo. FNT- $\alpha$  é uma citocina produzida por macrófagos em resposta à endotoxinas, inflamação e câncer. Entretanto, FNT tem ação múltipla no tecido adiposo, que incluem uma diminuição na atividade de lipase lipoprotéica, diminuição no transportador de glicose tipo 4 (GLUT 4) e aumento na LHS. Os níveis séricos de TNF- $\alpha$  estão aumentados em obesos humanos e correlacionam-se com o índice de massa corpórea, inclusive seus níveis diminuem com a perda de peso (KERN et al.,1995). Crespo et al.,(2001) em estudo com 52 pacientes obesos concluíram que a expressão de mRNA do TNF- $\alpha$  no fígado de obesos com EHNA está aumentada e correlacionada com a gravidade histológica.

A homeostasia de lipídeos é regulada por uma família de fatores de transcrição designada de SREBP (sterol regulatory element-binding proteins) que são responsáveis pela síntese e captação de colesterol, ácido graxo, triglicérides e fosfolípidos (HORTON; SHIMOMURA, 1999). No fígado, três SREBPs regulam a produção de lipídeos, sendo o SREBP-1c o principal regulador da transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxos (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). Shimomura et al., 1999 e 2000 em experiências com camundongos ob/ob sugerem que a esteatose hepática da RI é causada pelo acúmulo de SREBP-1c decorrente da hiperinsulinemia, levando ao aumento da expressão de genes lipogênicos, a síntese de ácido graxos e triglicérides.

A hepatite alcoólica apresenta grandes semelhanças histológicas com a EHNA, sugerindo que mecanismos comuns de dano hepático possam estar envolvidos. A peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo e o dano hepático mediado por citocinas são os principais envolvidos na patogênese das duas patologias. As causas de EHNA secundário, incluindo uso de drogas, produtos químicos, doença de Wilson e cirurgias bariátricas com bypass jejunal têm em comum o aumento da produção mitocondrial de ERO (espécies reativas de oxigênio) que são fortemente capazes de induzir peroxidação lipídica. Pesquisadores relataram que a disfunção mitocondrial que está presente nos pacientes com EHNA e a presença de megamitocôndrias contendo inclusões lineares cristalinas possam corresponder ao dano mitocondrial resultante da formação aumentada de ROS e TNF- $\alpha$ . (SANYAL et al., 2001; PESSAYRE et al., 2001; FROMENTY et al., 2004)

Com relação aos mecanismos de fibrose hepática, pesquisadores têm sugerido um importante papel da leptina na fibrogênese hepática, reforçando a associação entre o grau de obesidade e o risco de fibrose em EHNA em modelos animais. A leptina é uma proteína secretada primariamente pelo tecido adiposo, tendo dessa forma correlação direta com a massa de tecido adiposo corporal e pode ser induzida por citocinas inflamatórias e pela insulina. Saxena et al.,(2002) em estudos com ratos demonstraram que a leptina pode promover a fibrogênese hepática diretamente por um efeito autócrino nas células estrelares e indiretamente pela estimulação da produção do fator de transformação do crescimento  $\beta$  (FTC- $\beta$ ) pelas células endoteliais e células de Kupffer.

### 2.1.3 Diagnóstico

#### 2.1.3.1 Quadro clínico e diagnóstico laboratorial

A maioria dos pacientes com DHGNA, na época do diagnóstico, não apresentam sinais ou sintomas de doença hepática, sendo que alguns pacientes referem desconforto ou até dor em topografia de hipocôndrio direito do abdômen e sensação de fadiga. A investigação para DHGNA é tipicamente iniciada depois de achado incidental de anormalidade das enzimas hepáticas ou hepatomegalia ao exame físico, presente em 12-75% dos pacientes. (LUDWIG, et al.,1980; MATTEONNI, et al.,1999; ÂNGULO, et al.,1999)

A anormalidade laboratorial mais comum ou única observada em pacientes com DHGNA corresponde ao aumento dos níveis séricos das aminotransferases (abaixo de 1,5 vezes o limite superior de normalidade), com predomínio da alanina aminotransferase (ALT). Os níveis séricos de fosfatase alcalina e de gama-glutamiltransferase podem estar elevados em 2 a 3 vezes o valor normal em cerca de 50% dos pacientes, (LUDWIG et al.,1980; BACON et al.,1994; SHETH et al.,1997; ANGULO et al.,1999; MATTEONI et al.,1999)

Bacon et al., (1994) e Angulo et al., (1999) relataram níveis séricos elevados de ferritina em aproximadamente metade dos pacientes com DHGNA e o índice de saturação da transferrina aumentada em 10% dos pacientes. Deguti et al., (2003), avaliaram 32 pacientes com diagnóstico de EHNA e não encontraram evidência de associação de sobrecarga de ferro no tecido hepático e mutação da hemocromatose (HFE) nesses pacientes.

Devido a forte associação de síndrome metabólica e DHGNA, hiperglicemia é visto em um terço dos pacientes. Dessa forma, avaliação laboratorial da sensibilidade à insulina

deve ser feita em todos os pacientes com suspeita de DHGNA. A sensibilidade á insulina pode ser avaliadas pelos seguintes métodos:

- Insulina sérica de jejum: Para avaliação de resistência à insulina, o exame isolado apresenta baixa sensibilidade e especificidade.
- Homeostasis Model Assessment (HOMA) e Quantitative Insulin Check Index (QUICKI): São modelos matemáticos que utilizam a glicemia e insulina sérica de jejum, os dois modelos apresentam uma acurácia superior à insulina de jejum.
- Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico: Essa técnica é considerada o “padrão ouro” para avaliar a sensibilidade á insulina. Entretanto a técnica, dada a sua alta complexidade, é pouco utilizada para estudos epidemiológicos. (OLIVEIRA et al., 2005)

#### 2.1.3.2 Diagnóstico por métodos de imagem

A infiltração gordurosa do fígado produz um aumento difuso da ecogenicidade na ultrassonografia. Joseph et al., (1991) para estabelecer a precisão da ultrassonografia na avaliação da DHGNA, realizaram estudo comparativo com avaliação histológica de biopsias hepáticas de 50 pacientes e determinou uma sensibilidade de 89% e uma especificidade de 93% para detecção de esteatose e uma sensibilidade e especificidade de 77% e 89%, respectivamente, para detecção de fibrose hepática. Qayyum et al., (2009), compararam exames histológicos de 67 pacientes com diagnóstico de DHGNA e analisaram 3 modalidades de diagnóstico por imagem (ultrassonografia, ressonância nuclear magnética e tomografia computadorizada) concluindo que a ressonância nuclear magnética é o melhor exame para detectar esteatose hepática.

#### 2.1.3.3 Diagnóstico histológico

Embora a presença de esteatose hepática possa ser fortemente suspeitada pelos fatores de risco e avaliação clínica, os testes bioquímicos hepáticos e os métodos radiológicos têm pouca correlação com os achados histológicos.

A biópsia hepática é considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico e estadiamento da DHGNA, pois permite identificar com precisão e quantificar o grau de esteatose, inflamação, de necrose e fibrose hepática, dessa forma, estima o prognóstico e progressão da doença (BRUNT, 2001; NEUSCHWANDE-TETRI et al, 2003). Com relação a indicação para a biópsia, não existe consenso e requer individualização. Os exames de imagem e

marcadores laboratoriais de lesão hepática, principalmente para fibrose, são limitados e necessitam de mais estudos para definir a sua correlação com a gravidade da doença.

Brunt et al., (1999), baseado na avaliação histológica de 51 biópsias hepáticas de pacientes com EHNA propuseram um sistema de graduação das lesões esteatóticas e necro-inflamatórias e estadiamentos dos tipos de fibrose (Tabela 1).

**Tabela 1** Gradação e estadiamento das lesões histopatológicas de EHNA

Grau 1, Leve
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteatose: predominantemente macrovesicular, variando de &lt; 33% a 66% dos lóbulos</li> <li>• Balonização: ocasionalmente observado; zona 3 dos hepatócitos</li> <li>• Inflamação lobular: inflamação aguda (polimorfonucleares) leve e crônica (mononucleares) ocasional</li> <li>• Inflamação portal: ausente ou leve</li> </ul>
Grau 2, Moderada
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteatose: de qualquer grau, usualmente mista macro e microvesicular</li> <li>• Balonização: presente na zona 3</li> <li>• Inflamação lobular: polimorfonuclear podem ser notados associados com hepatócitos balonizados e ou fibrose peri-celular; inflamação crônica leve</li> <li>• Inflamação portal: ausente, leve a moderada.</li> </ul>
Grau 3, Severa
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteatose: usualmente &gt; 66% (zona 3 ou panacinar); comumente esteatose mista</li> <li>• Balonização: predominantemente na zona 3; marcante</li> <li>• Inflamação lobular: inflamação aguda e crônica; polimorfonuclear podem aparecer concentrados em áreas de balonização e fibrose peri-sinusoidal na zona 3</li> <li>• Inflamação portal: leve ou moderada; não predominante ou marcante</li> </ul>
Estadiamento da fibrose
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estádio 1: fibrose peri-venular, peri-sinusoidal ou peri-celular na zona 3, focal ou extensa</li> <li>• Estádio 2: Estádio 1 + fibrose peri-portal, focal ou extensa</li> <li>• Estádio 3: fibrose em ponte, focal ou extensa</li> <li>• Estádio 4: cirrose com ou sem fibrose peri-sinusoidal residual</li> </ul>

Modificado por Brunt et al. (1999).

#### 2.1.4 Tratamento

Em relação ao tratamento da DHGNA, até o presente momento, não há grandes estudos controlados randomizados publicados sobre terapias específicas que sirvam de base para recomendações terapêuticas definitivas. Dessa forma, as estratégias terapêuticas no manejo desses pacientes visam apenas tratar as condições predisponentes associadas, como a obesidade, síndrome metabólica e dislipidemia. O perfil de eficácia e segurança da farmacoterapia no tratamento da DHGNA ainda permanece incerto. (CHEUNG et al., 2010)

##### 2.1.4.1 Exercícios e dieta

As recomendações iniciais correspondem à redução gradual de peso nos pacientes obesos e mudanças no estilo de vida, com estímulo a realização de exercícios físicos regulares e modificações dietéticas. A dieta recomendada deve ser hipocalórica e balanceada. (ZELBER-SAGI et al., 2011).

Em vários estudos realizados com animais, os pesquisadores demonstraram que uma dieta rica em gordura rapidamente induz esteatose hepática (MCCUSKEY et al., 2004; SAMUEL et al., 2004). Em seres humanos, Westerbacka et al., (2005) avaliaram a gordura hepática por espectroscopia de prótons em 10 mulheres com sobrepeso e constataram que a dieta rica em gordura (56%) aumentou o depósito de gordura hepática em 35% e a dieta pobre em gordura (16%) reduziu a gordura em 20%, sem variação do IMC. Em outro estudo, 74 pacientes com obesidade grau 3 (IMC > 40) foram submetidos a cirurgia bariátrica com biópsia hepática (90% deles com DHGNA) e passaram por uma avaliação nutricional pré-operatória utilizando um recordatório alimentar de 24 h e concluíram que dietas ricas em açúcares apresentam maior poder de dano hepático que dietas ricas em gordura. (SOLGA et al., 2004)

No entanto, diferente das doenças cardiovasculares e das manifestações metabólicas promovidas pela resistência à insulina, não há evidências epidemiológicas de que hábitos alimentares podem estar associados com esteatose hepática. (BEDOGNI; BELLENTANI 2004). Os inquéritos epidemiológicos relacionando tipos de dietas com DHGNA apresentam amostras pequenas. Musso et al., (2003) utilizaram um recordatório alimentar complexo de 7 dias em 25 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA e detectaram que dietas ricas em gordura saturada e colesterol e pobres em gordura poli-insaturadas, fibras e vitaminas C e E estão associadas a EHNA. Corroborando, Toshimitsu et al., (2007) em um inquérito alimentar

de 3 dias em 28 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA e 18 pacientes com apenas esteatose hepática constataram o consumo desequilibrado nos pacientes com EHNA, tendo como característica alto consumo de ácidos graxos saturados e carboidratos simples e baixa ingestão de gordura poli-insaturada, proteínas e zinco.

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3), derivados da ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos linolênicos apresentam efeito protetor na DHGNA evidenciados em 2 estudos clínicos. O primeiro foi um ensaio clínico controlado que avaliou o efeito de um ano de suplementação de AGPI n-3 (ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) na razão de 0,9/1,5) na dose de 1000 mg diário em 42 pacientes com diagnósticos de DHGNA contra 14 pacientes que recusaram tratamento (controle). A suplementação de AGPI n-3 diminuiu em 64% o grau de esteatose hepática (mensurado por ultrassonografia) e normalizou os níveis de enzimas hepáticas. (CAPANNI et al., 2006). No segundo estudo, 23 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA receberam por 12 meses suplementação com 2.700 mg diários de EPA sendo constatado redução significativa nos níveis das enzimas TGP (26%), TGO (24%) e ferritina (46%) e melhora ultrassonográfica da esteatose hepática em 52%. (TANAKA et al., 2008).

Hussein et al. (2007) avaliaram diferentes tipos de dieta com gordura em ratos Sprague-Dawley e constataram que dieta rica em AGMI (azeite de oliva) diminuiu em 32% o acúmulo de triglicerídeos hepático. Entretanto, em humanos, nenhuma publicação relacionou a baixa ingestão de AGMI com DHGNA. (ZELBER-SAGI et al., 2011). Com relação ao colesterol, os resultados de estudos observacionais têm sido conflitantes. Alguns estudos não demonstraram diferenças entre a alta ingestão de colesterol e DHGNA (ZELBER-SAGI et al., 2007).

Ao longo das últimas décadas, a questão nutricional relacionada à perda de peso como tratamento para DHGNA vem modificando paulatinamente. Nos primórdios do tratamento, entre as décadas 60 e 70, as dietas com níveis de calorias muito baixa (< 500 Kcal) levando à redução drástica de peso eram a base do tratamento. Entretanto, apesar da melhora da esteatose, histologicamente era visto piora do dano hepático, indicado pelo aumento da fibrose e necrose focal (ROZENTAL et al., 1967). Andersen et al., (1991) avaliaram a evolução histológica de 41 pacientes com obesidade mórbida e EHNA submetidos a dieta hipocalórica (< 400 Kcal/dia) e constataram que nenhum dos pacientes que perderam menos de 1,6 kg/semana de peso desenvolveram fibrose hepática, definindo o limite superior para a taxa de redução de peso em pacientes com DHGNA.

Atualmente, o tratamento dietético da DHGNA é estruturado em dietas equilibradas combinado com um programa de terapia comportamental visando modificação do estilo de vida em longo prazo. (PROMRAT et al., 2010; ZELBER-SAGI et al., 2011). Lazo et al., (2010) testaram o efeito de uma intervenção de estilo de vida durante 12 meses intensivos em 96 pacientes diabéticos e com sobrepeso ou obesidade que incluía uma restrição calórica moderada acompanhada de atividade física supervisionada e reuniões multidisciplinares semanais, enquanto o grupo controle recebeu apenas informações educacionais sobre dieta e atividade física. O grupo de pacientes que foram supervisionados perdeu mais peso (- 8,5% vs - 0,05%;  $P < 0,01$ ), obteve um maior declínio na esteatose (- 50,8% vs - 22,8%;  $P = 0,04$ ) e na hemoglobina glicada (- 0,7 vs - 0,2%,  $P = 0,04$ ). Não houve diferença significativa em relação às enzimas hepáticas.

#### 2.1.4.2 Suplementação vitamínica e efeitos antioxidantes

- **Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol):** É uma vitamina lipossolúvel, com efeito, antioxidante. A utilização de vitamina E em doses elevadas de 300 – 1000 UI/dia para o tratamento da DHGNA têm demonstrando resultados discordantes. Kugelmas et al., (2003), em estudo controlado e randomizado, com 17 pacientes com EHNA, que receberam 800 U/dia de vitamina E por 6 semanas, observaram que não houve diferença significativa nos níveis das transaminases, citocinas (FNT-a, interleucina 6 e 8) e ácido hialurônico (marcador de fibrose hepática). Sanyal et al., (2004) ao desenvolverem estudo piloto prospectivo randomizado com o uso de vitamina E (400 UI/dia) também não relataram melhora significativa na histologia (inflamação e fibrose hepática) após 6 meses de tratamento. Entretanto, Hasegawa et al., (2001), administraram vitamina E na dose de 300UI diárias em 20 pacientes com diagnóstico de DHGNA por um período de 1 ano, observaram melhora histológica (esteatose, inflamação e fibrose) e diminuição nos níveis do FCT- $\beta$ 1, potente estimulador de fibrose hepática. Recentemente, Sanyal et al. (2010) ao desenvolver estudo multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo controlado, realizado ao longo de 96 semanas, avaliaram o tratamento com vitamina E (800 U/dia) ou pioglitazona (30 mg/dia) em 247 pacientes com diagnóstico de EHNA sem diabetes. A terapia com vitamina E em comparação ao placebo apresentou melhora significativa da EHNA (43% vs. 19%,  $P=0,001$ ), não visto no grupo da pioglitazona (34% vs 19%,  $P=0,04$ ) e ambos os tratamentos melhoraram significativamente os parâmetros

histológicos: esteatose, inflamação lobular e balonização hepatocelular, entretanto sem melhora no grau de fibrose hepática.

- **Vitamina C:** É uma vitamina hidrossolúvel que atua como cofator para enzimas envolvidas na biossíntese de colágeno, carnitina e tirosina, metabolismo de hormônios (catecolaminas e neuropeptídios) e desempenha ação antioxidante indireta na membrana celular, doando elétrons ao radical  $\alpha$ -tocoferoxil (radical livre da vitamina E), contribuindo para proteger a membrana celular da peroxidação lipídica (MAY, 1999). Harrison et al., (2003) ao realizar estudo prospectivo, randomizado, duplo cego, placebo controlado em 45 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA, avaliaram o tratamento da vitamina E (1000 U/dia) associado com vitamina C (1000 mg/dia) por 6 meses e observaram melhora apenas no grau de fibrose ( $p=0,002$ ), sem melhora na atividade necroinflamatória e nas transaminases.
- **Vitamina D:** Nos últimos anos, vários pesquisadores associam a deficiência de vitamina D como fator de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas (resistência à insulina e disfunção das células betas), (KAYANIYIL et al., 2010). Targher et al., (2007) dosaram os níveis sanguíneos da vitamina D (25-OH-vitamina D) de 60 pacientes com diagnóstico de DHGNA e 60 controles e constataram que os pacientes com DHGNA apresentaram níveis significativamente menores ( $51.0\pm 22$  vs.  $74.5\pm 15$  nmol/L,  $P<0.001$ ) independentes da idade, sexo, IMC, creatinina, cálcio, resistência à insulina e síndrome metabólica. Barchetta et al., (2011) compararam 162 pacientes com SM e DHGNA com 100 pacientes com apenas SM e relacionaram DHGNA com deficiência de vitamina D independente da idade, sexo, triglicerídeos, HDL-colesterol e glicemia. Até o presente momento, nenhuma pesquisa publicada avaliou o potencial terapêutico da vitamina D no tratamento da DHGNA.
- **Betaína:** é um aminoácido necessário para a síntese hepática de S-adenosilmetionina que, por sua vez, é precursor da glutatona, tripéptido linear (ácido glutâmico, cisteína e glicina) com funções anti-oxidante intra-celular. Assim como a vitamina E, as pesquisas publicadas são controversas. Abdelmalek et al., (2001) administraram a betaína por 12 meses a 7 pacientes com EHNA e obtiveram melhora significativa nos níveis das transaminases e parâmetros histológicos (esteatose, necroinflamação e fibrose). Entretanto, recentemente, o Abdelmalek et al., (2009) ao realizar estudo placebo

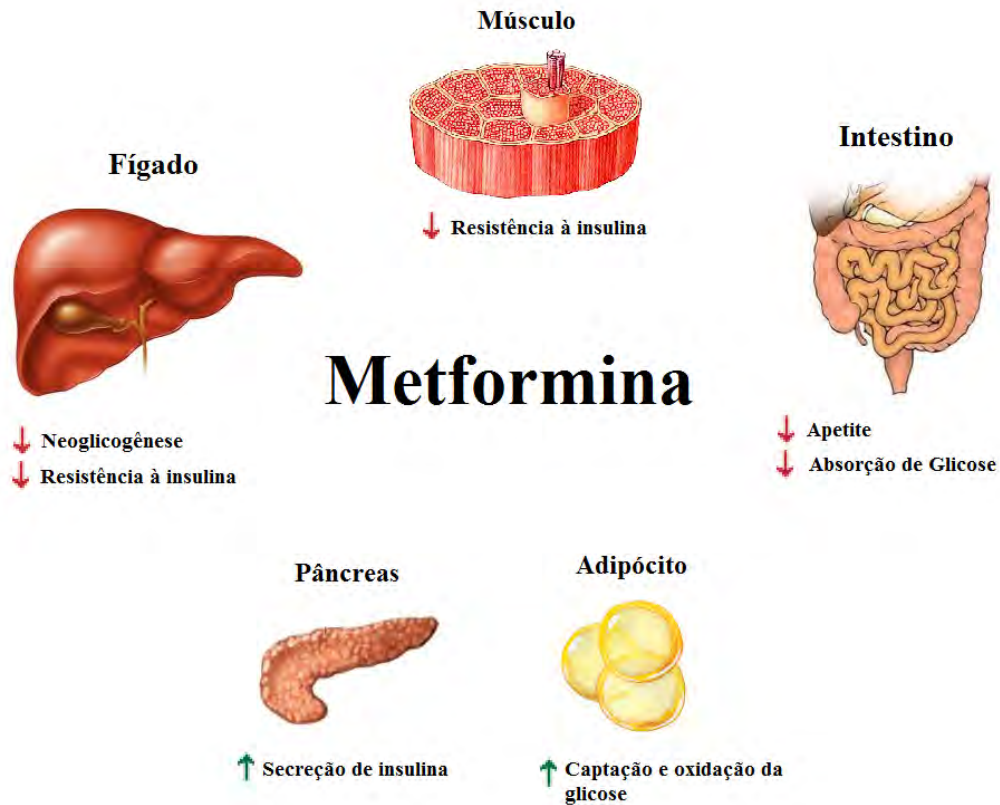
controlado e randomizado com 35 pacientes com EHNA (18 pacientes placebo e 16 em uso de betaína 20g/dia por 12 meses) não encontraram diferenças significativas em relação aos níveis de transaminases, insulina, adiponectina, leptina, citocinas (FNT- $\alpha$ , interleucina 6 e 8) e parâmetros histológicos.

- **N-acetilcisteína:** derivada da N-acetilação do aminoácido L-cisteína, apresenta efeito antioxidante através da interação do seu grupo SH com grupos oxidantes, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e promovem a produção intracelular de glutathione. Estudos experimentais com ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em gordura para induzir EHNA demonstraram a ação antioxidante da N-acetilcisteína no fígado, entretanto não apresentaram melhora histológica superior à dieta. (SAMUHASANEETO et al., 2007)

#### 2.1.4.3 Drogas

Para pacientes com DHGNA associado ao diabetes mellitus tipo 2 ou a síndrome metabólica, o tratamento principal se concentra no controle glicêmico ou na melhora da sensibilidade à insulina. Dessa forma, as principais medicações para o tratamento da DGHNA correspondem ao uso de agentes sensibilizantes da insulina.

- **Metformina:** é um antidiabético oral da classe das biguanidas, medicamento de escolha no tratamento inicial do diabetes mellitus tipo 2 e único hipoglicemiante com a capacidade de reduzir o risco cardiovascular. Seu mecanismo de ação envolve a inibição endógena da produção de glicose (gliconeogênese), principalmente no fígado e possivelmente diminui a resistência á insulina por reduzir o conteúdo de gordura do fígado, músculos e tecido gorduroso através da ativação da enzima proteína-quinase dependente de AMP, que resulta em aumento da oxidação mitocondrial e diminuição da síntese de ácidos graxos (HUNDAL et al., 2003).



**Figura 1** Ação da metformina em diferentes sistemas. **Fonte:** Adaptado de Hundal e Inzucchi (2003).

No momento, as evidências de que pacientes com EHNA apresentem melhora histológica com a medicação é controversa. Vários pequenos estudos de 4 a 6 meses de duração com dose de 1 a 1,5 grama/dia, têm apresentado apenas melhora nos níveis das transaminases. Garinis et al., (2010), ao realizarem estudo com 50 pacientes com diagnóstico ultrassonográfico de esteatose hepática, comparando o uso de metformina 1 g/dia com dieta hipocalórica por 6 meses, concluíram que o efeito da metformina para tratamento da esteatose hepática e outros parâmetros metabólicos (resistência a insulina e dislipidemias) é superior ao tratamento dietético isolado. No único estudo clínico controlado e randomizado publicado os pesquisadores compararam três grupos: metformina (2g/dia; n=55), vitamina E (800 U/dia; n=28) e dieta (N=27). Com base nos resultados da análise multivariada, o tratamento com metformina foi associado a maiores taxas de normalização das aminotransferases (56%) e melhora histológica (esteatose, necroinflamação e fibrose) que os demais grupos, independente da idade, sexo e IMC. (BUGIANESIS et al., 2005).

- **Glitazonas:** São drogas sensibilizadoras da ação da insulina, tendo como mecanismo de ação efeito agonista nos receptores nucleares PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptors do tipo  $\gamma$ ) que são expressos principalmente no tecido adiposo. As glitazonas promovem remodelamento dos adipócitos com diminuição da gordura visceral e aumento da gordura celular subcutânea promovendo diminuição da secreção de citocinas inflamatórias (FNT- $\alpha$ , interleucina 6) e ácidos graxos livres e aumento da concentração sérica de adiponectina. (MARTENS et al., 2002; MIYAZAKI et al., 2004). Pesquisadores em dois ensaios clínicos utilizando a pioglitazona (30 mg/dia) e rosiglitazona (8 mg/dia) por 48 semanas demonstraram melhoras significativas na alanina aminotransferase (ALT) e nas lesões histológicas (esteatose e necroinflamação), entretanto apenas os pacientes que fizeram uso da pioglitazona apresentaram melhora na fibrose hepática. (NEUSCHWANDER-TETRI et al., 2003; PROMRAT et al., 2004).
- **Orlistat:** é um análogo mais estável e parcialmente hidrolisado da lipstatina, potente inibidor de lipases do trato gastrointestinal, reduzindo a hidrólise dos triglicerídeos ingeridos e impedindo a absorção de aproximadamente 30% da gordura ingerida. Pela sua ação em diminuir a absorção de gordura, promove perda de peso ( $\pm$  8% em 4 anos). (TORGERSON et al., 2004). Hussein et al., (2007) ao realizarem estudo não comparativo (série de casos) administraram orlistat (120 mg/ 3x/dia) a 14 pacientes obesos com EHNA e obtiveram melhora dos parâmetros histológicos e metabólicos (transaminases, colesterol total, LDL-colesterol e triglicerídeos). Entretanto, em outro estudo, 41 pacientes com sobrepeso e diagnóstico de EHNA foram randomizados para receber uma dieta hipocalórica (1400 Kcal/dia) associada à vitamina E (800U/dia), com ou sem orlistat (120 mg/3x/dia) por 36 semanas sendo observado pelos pesquisadores que o orlistat não acrescentou melhora na perda de peso (-8,3% vs -6%, P=0,86), transaminases, sensibilidade à insulina, adiponectina, hemoglobina glicada e parâmetros histológicos em relação ao tratamento isolado com vitamina E e dieta (HARRISON et al., 2009).
- **Sibutramina:** é uma amina terciária inibidora da recaptação da serotonina e da noradrenalina, conferindo uma ação sacietogênica e em experimentos animais, ela também estimula a termogênese no tecido adiposo marrom (HALFORD et al., 2011). Sabuncu et al. (2003) iniciaram sibutramina como tratamento para EHNA a 13 pacientes e orlistat a 12 pacientes e observaram melhora nas enzimas hepáticas, redução de peso e

regressão da esteatose hepática visto no ultrassom, entretanto sem diferenças significativas entre os grupos.

#### 2.1.4.3.2 Drogas hepatoprotetoras

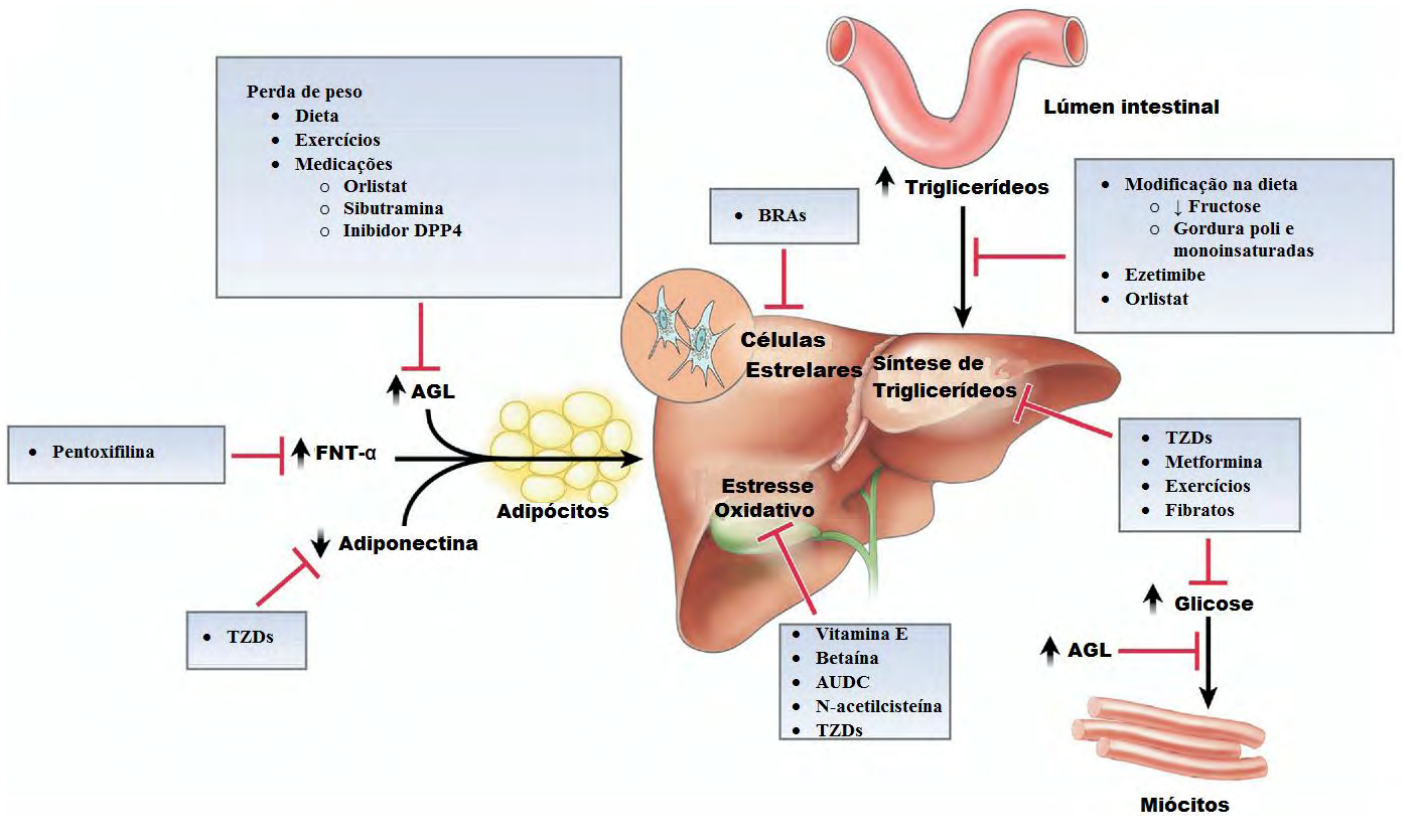
- **Ácido ursodesoxicólico (AUDC):** é um ácido biliar hidrofílico não tóxico encontrado na bile e tem como mecanismo de ação inibir a síntese hepática de colesterol e promove a síntese de ácidos biliares hidrofílicos que são menos hepatotóxicos, além de ter efeitos citoprotetores, imunomoduladores e anti-apoptóticos. (ANGULO, 2002). Laurin et al., (1996) ao realizarem um estudo piloto, avaliaram e compararam o uso do AUDC (13-15 mg/kg/dia) com clofibrato (2g/dia) por 12 meses e demonstraram melhora ou normalização das enzimas hepáticas e redução no grau de esteatose apenas no grupo do AUDC. Ratziu et al. (2011) ao realizarem estudo multicêntrico, duplo cego, randomizado e placebo controlado avaliaram a eficácia do AUDC (28-35 mg/kg/dia) por 12 meses em 126 pacientes com diagnóstico histológico de EHNA. Os pacientes do grupo do AUDC apresentaram redução significativa dos níveis da ALT (-28,3% vs -1,6%,  $P < 0,001$ ) e do marcador de fibrose hepática, FibroTest® ( $P < 0,001$ ). Entretanto não foram avaliados os parâmetros histológicos no fim do tratamento.
- **Pentoxifilina (PTX):** é um derivado da metilxantina, inibidor não seletivo da fosfodiesterase, promovendo a diminuição na produção de FNT- $\alpha$  e interleucina 1 e 6 (citocinas pró-fibróticas) e consequentemente dano hepático. Satapathy et al., (2007) trataram 9 pacientes com EHNA por 12 meses com PTX (400 mg/3x/dia) e observaram redução significativa da enzima ALT ( $111 \pm 53$  IU/L para  $45 \pm 19$  IU/L,  $P = 0,003$ ), necroinflamação (- 67%), esteatose (- 55%) e fibrose (-67%). Lee et al., (2008) ao realizarem estudo randomizado, placebo-controle, avaliaram 20 pacientes com EHNA por 3 meses e concluíram que a PTX é efetiva em reduzir as transaminases hepáticas, no entanto não foi avaliado parâmetros histológicos pós-tratamento. Recentemente, Zein et al., (2011) ao realizarem estudo duplo cego, compararam o efeito da PTX (400 mg/3x/dia) versus placebo em 55 pacientes com EHNA por 1 ano e verificaram redução significativa na esteatose, inflamação lobular e fibrose hepática.

- **Bloqueadores dos receptores da angiotensina II (BRAs):** São anti-hipertensivos de uso corrente no tratamento da nefropatia diabética e insuficiência cardíaca. O mecanismo de ação dos BRAs é basicamente atribuída à sua capacidade de bloquear especificamente os receptores AT1 da angiotensina II. Mais recentemente, pesquisadores vem demonstrando novas ações dos BRAs em outros receptores, como os receptores nucleares PPAR- $\gamma$  e na redução do ácido úrico através de um efeito uricosúrico relacionado apenas ao losartan (SCHUPP et al., 2006; DIEZ, 2006). Yokohama et al. (2004) acompanharam 7 pacientes hipertensos e com EHNA em uso de losartan (50mg/dia) por 48 semanas e observaram melhora nos níveis séricos de ferritina, FTC- $\beta$ , transaminases, necroinflamação e fibrose hepática.

#### 2.1.4.3.3 Drogas hipolipemiantes

- **Fibratos:** derivados do ácido fíbrico agem a partir da estimulação dos receptores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas-alfa (PPAR- $\alpha$ ), levando ao aumento da produção e da ação da lipase lipoprotéica (LPL), redução da apoproteína CIII, aumento da excreção biliar do colesterol hepático, efeito antioxidante (diminuindo a oxidação das LDL-colesterol), efeito anti-inflamatório (inibe a expressão das interleucinas 1 e 6) e redução do fluxo de ácidos graxos para o fígado. Dessa forma são medicamentos de escolha na hipertrigliceridemia e podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas (MCKEAGE; KEATING, 2011). Hiperlipidemia, particularmente hipertrigliceridemia está presente em cerca de 20-80% dos pacientes com EHNA. Entretanto, os estudos com fibratos são frustrantes. Laurin et al. (1996) realizaram estudo controlado com seguimento histológico em 16 pacientes com DHGNA e hipertrigliceridemia e observaram que o uso de clofibrato (2g/dia) por 1 ano não apresentou efeito significativo tanto dos parâmetros bioquímicos quanto na histologia hepática e Fernandez-Miranda et al. (2008) acompanharam 16 pacientes com diagnóstico de DHGNA em uso de fenofibrato (200mg/dia) por 48 semanas e no final do estudo observaram melhora apenas no grau de balonização dos hepatócitos, sem efeito significativo no grau de esteatose, inflamação e fibrose hepática, apesar da melhora metabólica, inclusive nos níveis das enzimas hepáticas.

- **Estatina:** são agentes hipolipemiantes que atuam primariamente no fígado na inibição da HMG-CoA redutase, enzima fundamental na síntese do colesterol, levando a uma redução do colesterol tecidual e conseqüentemente aumento na expressão dos receptores de LDL e têm sido associados com uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana (POLI, 2007). Kimura et al (2010) avaliaram o efeito da atorvastatina (10 mg/dia) em 43 pacientes com diagnóstico de EHNA e hipercolesterolemia por 12 meses e observaram melhora significativa no grau de esteatose e atividade necroinflamatória hepática. Entretanto, Hyogo et al (2011) em estudo com uma nova estatina sintética (pitavastatina 2 mg/dia) por 12 meses não observaram redução significativa no grau de necroinflamação e fibrose hepática, apenas foi visto redução nos níveis das transaminases.
- **Ezetimiba:** atuam inibindo a absorção de colesterol nos enterócitos através da inibição do transporte do colesterol por enzimas transportadoras específicas. Yoneda et al. (2010) trataram 10 pacientes com hipercolesterolemia e EHNA associado por 6 meses com ezetimiba (10mg/dia) e observaram redução nas transaminases, LDL-colesterol, proteína C Reativa e colágeno tipo 4 e na avaliação histológica foram observados apenas redução da necroinflamação e esteatose, sem efeito no grau de fibrose.



**Figura 2** Os potenciais efeitos fisiopatológicos de terapias que estão sob investigação. BRAs – Bloqueadores dos receptores da angiotensina, TZDs – Tiazolidionas. **Fonte:** Adaptado de Torres e Harrison (2008).

**Tabela 2** Drogas com efeitos anti-oxidantes e hepatoprotetoras

<b>Autor/ ano</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Número</b>	<b>Duração (meses)</b>	<b>TGP</b>	<b>Outros marcadores avaliados</b>	<b>Esteatose</b>	<b>Histologia Inflamação</b>	<b>Fibrose</b>
<b>Hasegawa/ 2001</b>	Vitamina E (300UI/dia)	20	12	↓	↓ FCT-β1	↓	↓	↓
<b>Kugelmas/ 2003</b>	Vitamina E (800UI/dia)	16	3	-	FNT-α, interleucina 1 e 6 e ácido hialurônico – sem alteração	NA	NA	NA
<b>Harrison/ 2003</b>	Vitamina C (1g/dia) + Vitamina E (1000U/dia)	45	6	-	-	-	-	↓
<b>Abdelmalek/ 2001</b>	Betaína	7	12	↓	-	↓	↓	↓
<b>Abdelmalek/ 2009</b>	Betaína	35	12	↓	Insulina, adiponectina, leptina, FNT-α, inter 1 e 6 – sem alteração	-	-	-
<b>Laurin/ 1996</b>	AUDC	24	12	↓	-	↓ (USG)	NA	NA
<b>Ratziu/ 2011</b>	AUDC	126	12	↓	↓ FibroTest®	NA	NA	NA
<b>Sanjaya/ 2007</b>	Pentoxifilina	9	12	↓	-	↓	↓	↓
<b>Lee/ 2008</b>	Pentoxifilina	20	3	↓	-	NA	NA	NA
<b>Yokohama/ 2004</b>	Losartan	7	9	↓	↓ FTC-β e ferritina	NA	↓	↓
<b>Hussein/ 2007</b>	Orlistat	14	6	↓	-	↓	↓	↓
<b>Harrison/ 2009</b>	Orlistat + vitamina E	41	9	-	Insulina, adiponectina, hemoglobina glicada – sem alteração	-	-	-
<b>Sabuncu/ 2003</b>	Orlistat + Sibutramina	12 e 13	6	↓	-	↓ (USG)	NA	NA

**Tabela 3** Drogas sensibilizadores da insulina, redutores do peso e hipolipemiantes

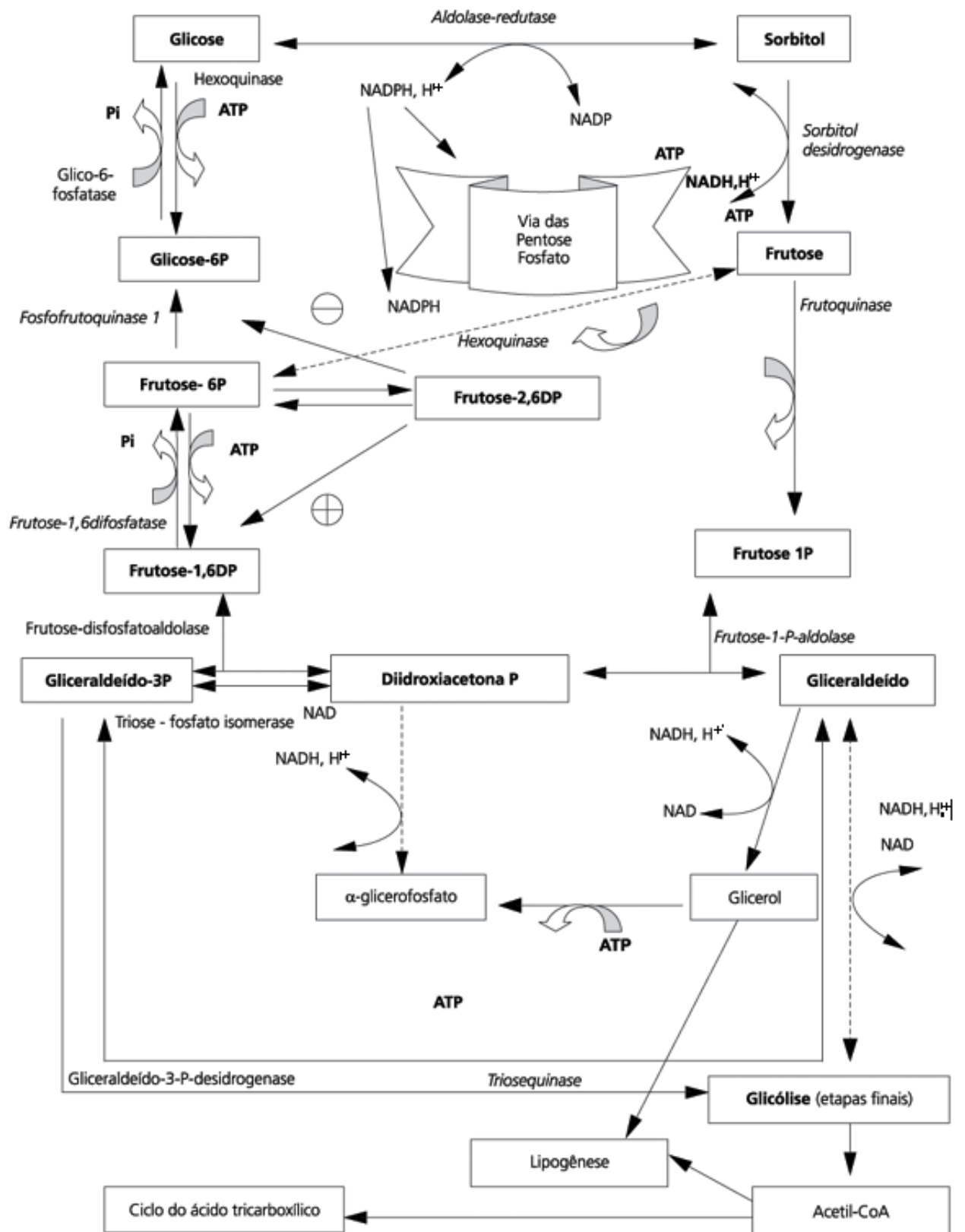
<b>Autor/ ano</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Número</b>	<b>Duração (meses)</b>	<b>TGP</b>	<b>Outros marcadores avaliados</b>	<b>Esteatose</b>	<b>Histologia Inflamação</b>	<b>Fibrose</b>
<b>Marchesini/ 2001</b>	Metformina	14	4	↓	-	NA	NA	NA
<b>Bugianesis/ 2005</b>	Metformina	110	12	↓	-	NA	NA	NA
<b>Nair/ 2004</b>	Metformina	15	12	↓	-	NA	NA	NA
<b>Promrat/ 2004</b>	Pioglitazona	18	11	↓	-	↓	↓	↓
<b>Sanyal/ 2004</b>	Pioglitazona + Vitamina E	20	6	-	-	-	↓	↓
<b>Sanyal/ 2010</b>	Pioglitazona vs Vitamina E	247	96	↓	-	↓	↓	-
<b>Neuschwander-Tetri/ 2003</b>	Rosiglitazona	30	11	↓	-	↓	↓	-
<b>Laurin/ 1996</b>	Clofibrato	16	12	↓	-	↓ (USG)	NA	NA
<b>Fernandez-Miranda/ 2008</b>	Fenofibrato	16	10	↓	-	↓	↓ apenas da balonização	↓
<b>Kimura/ 2010</b>	Atorvastatina	43	12	↓	-	↓	↓	-
<b>Hyogo/ 2011</b>	Pitavastatina	13	12	↓	-	-	-	-
<b>Yoneda/ 2010</b>	Ezetimibe	10	6	↓	↓ Colágeno tipo 4	↓	↓	-

## **2.2 Dieta rica em frutose associado à síndrome metabólica, hiperuricemia e esteato-hepatite não alcoólica**

Nas últimas duas décadas, a prevalência de obesidade e síndrome metabólica vem crescendo no mesmo ritmo que o consumo de alimentos ricos em frutose (ELLIOT et al., 2002). A ingestão de frutose, nos países desenvolvidos vem aumentando acentuadamente, cerca de 250% nos últimos 15 anos, em decorrência do maior consumo de produtos industrializados contendo frutose, como, por exemplo, adoçantes, refrigerantes e xarope de milho (BASCIANO et al., 2005; BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004).

A frutose é um monossacarídeo que é encontrado naturalmente em apenas alguns alimentos, principalmente frutas e verduras. O seu maior consumo é na forma de sacarose, um dissacarídeo composto de partes iguais de glicose e frutose. Nos Estados Unidos, a frutose é encontrada, principalmente, como componente do xarope de milho. (VOS et al., 2008)

A frutose é absorvida no intestino por dois mecanismos distintos, sendo o primeiro, por difusão facilitada mediada pela proteína GLUT (glucose transport) 5, que têm alta afinidade pela frutose e sua ação não depende da estimulação da insulina, enquanto, o segundo por co-transporte, dependente de glicose, gerando um aumento de 29% na absorção da frutose em associação com glicose na dieta. Na circulação, a frutose é transportada pela proteína GLUT 2 até o fígado, onde é rapidamente metabolizada pela enzima frutoquinase que fosforila no carbono 1 em frutose-1 fosfato, que posteriormente é cindida pela aldolase B em duas trioses, diidroxiacetona e gliceraldeído-fosfato. As trioses poderão participar de três vias metabólicas: entrar na via glicolítica para produzir ATP (energia) e piruvato, reduzir até glicerol e participar da síntese de triacilgliceróis e outros lipídios (lipogênese) ou sofrer condensação com formação de frutose 1,6 difosfato e posteriormente participar da gliconeogênese. A deficiência da enzima aldolase B (frutose-1-fosfato aldolase), também chamada de intolerância hereditária a frutose, resulta no mais sério erro inato de metabolismo envolvendo o metabolismo da frutose, a deficiência leva a acúmulo de frutose-1-fosfato causando depleção de ATP e fósforo inorgânico e aumento da degradação de nucleotídeos para ácido úrico, como consequência hiperuricemia. As crianças com esse defeito enzimático apresentam náuseas, vômitos, hipoglicemia, dor abdominal e até convulsão após ingestão de frutose e a persistência do uso da frutose a longo prazo ocasionará retardo no crescimento, insuficiência renal crônica e doença hepática progressiva culminando em cirrose hepática que é uma das principais causas de morte nessas crianças (HALLFRISCH, 1990).

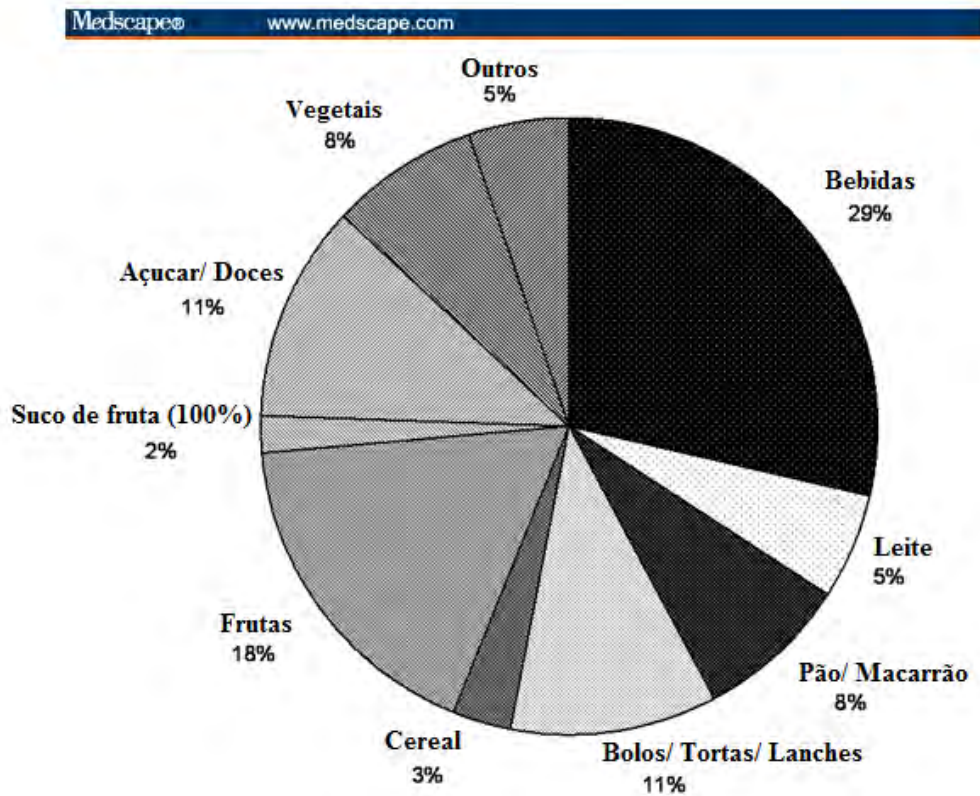


**Figura 3** - Vias metabólicas da frutose e inter-relação com as vias metabólicas dos glicídeos e lipídeos. Fonte: Barreiros; Bossolan; Trindade, 2005 adaptado de Hallfrisch (1990).

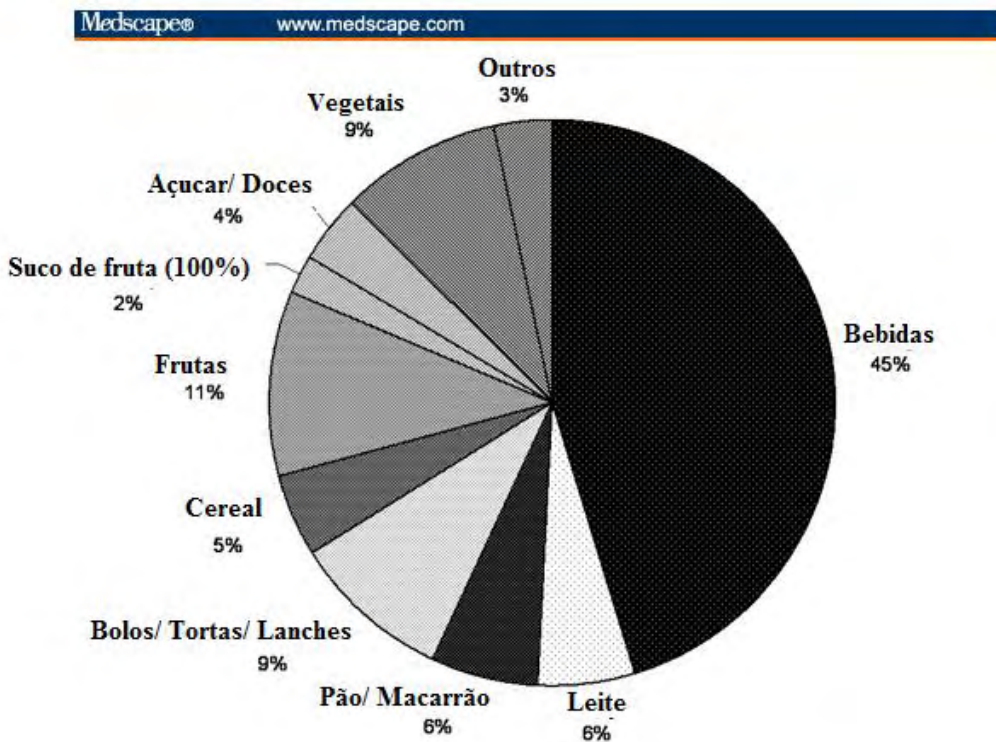
Park e Yetley, (1993) avaliaram dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Nationwide Food Consumption Survey (NFCS 1977-1978) e constataram que o consumo de frutose naquela época correspondia a aproximadamente 8% do total das calorias diárias, uma média de 37 g/dia, sendo a maioria representada por refrigerantes, sucos de fruta e doces de padaria. Vos et al, (2008) analisaram o consumo de frutose de 21.483 adultos e crianças através de dados do The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III - 1988-1994) e a média de consumo de frutose foi estimada em 54,7 g/dia, correspondente a 10,2% do total de calorias diárias, sendo que em adolescentes (12-18 anos) a média foi de 72,8 g/dia (12,1% calorias/dia). A distribuição percentual da frutose entre os tipos de alimentos analisados nesse estudo estão representadas nas figuras 4 e 5.

Bantle et al. (2000) avaliaram o efeito de uma dieta rica em frutose (17% do total das calorias diárias) por 6 semanas em 24 adultos saudáveis sobre o metabolismo lipídico e observaram aumento em 32% dos níveis de triglicerídeos apenas nos homens. Lê et al. (2009) administraram uma dieta rica em frutose (3,5g/Kg/dia, 35% do total de calorias diárias) por 7 dias a 16 homens saudáveis com antecedentes familiares de diabetes tipo 2 (DM2) e 8 homens sem antecedentes (controle) e concluíram que dieta rica em frutose aumentaram os lipídios intra-hepáticos e intra-miocelular visto na espectroscopia por ressonância magnética nos dois grupos e no grupo com antecedente familiar de DM2 os níveis de triglicerídeos aumentaram 35% e a sensibilidade à insulina diminuiu em 27%.

Dessa forma, podemos afirmar que a ingestão de grande quantidade de frutose, ultrapassando 2 a 3 vezes a média diária de consumo relatada no NHANES III, pode promover alterações importantes no metabolismo, como a resistência à insulina e hipertrigliceridemia, dois grandes fatores de risco para doenças cardiovasculares e EHNA.



**Figura 4** - Distribuição do consumo de frutose entre os grupos e subgrupos de alimentos em adultos (Idade superior a 19 anos). Fonte: Vos, 2008.



**Figura 5** - Distribuição do consumo de frutose entre os grupos e subgrupos de alimentos em adolescentes (Idade entre 12 – 18 anos). Fonte: Vos, 2008.

Kogut et al., (1975) após infundirem 0,25 g/kg de frutose em seis crianças com intolerância hereditária a frutose, observaram aumentos nos níveis séricos de ácido úrico (4,1 mg/dl para 5,4 mg/dl) e na excreção urinária de ácido úrico (0,6 para 1,0 mg/mg de creatinina), concluído que a ingestão de frutose nesses pacientes produzia hiperuricemia pelo aumento da degradação de monofosfato de adenosina induzido pelo acúmulo de frutose-1-fosfato. Esse trabalho foi pioneiro na associação de ingestão de frutose e hiperuricemia em pacientes com intolerância hereditária a frutose.

Com relação à obesidade, a frutose pode levar ao ganho de peso independente do gasto energético, com possível participação direta da frutose no controle da saciedade. A frutose tem poder de inibição da saciedade no hipotálamo menor que a glicose (HARVEL et al., 2005). Essa diferença se deve a inabilidade da frutose em estimular agudamente a produção de insulina e leptina e suprimir a grhulina (JOHNSON et al., 2007). Shapiro et al., (2008) realizaram experimento com ratos da espécie Sprague Dawley e concluíram que o uso crônico de dieta rica em frutose promove resistência à leptina com subsequente aumento do peso. Os ratos alimentados com dieta com 60% de frutose não apresentaram resposta anorexígena à injeção intraperitoneal de leptina.

O metabolismo da frutose tem efeitos importantes no metabolismo da glicose e lipídios. Experimentalmente, principalmente em ratos, a resistência à insulina vem sendo estimulada através da sobrecarga de frutose na dieta, por ração comercial rica em frutose (60%) (HWANG et al., 1987; NAKAGAWA et al., 2006) ou adicionando frutose na água de beber (10 a 20%) (DAÍ;MCNEILL, 1995).

Nakagawa et al., (2006), ao realizarem estudos com ratos Sprague-Dawley, demonstraram que dieta rica em frutose (60%) induz hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, HDL baixo e hiperuricemia acompanhado de diminuição dos níveis de óxido nítrico no endotélio. Elliot et al., (2002) e Kelley et al., (2004) comprovaram que o aumento da lipogênese hepática com elevação da produção de VLDL decorrente de efeito lipogênico da frutose, resultaria na hipertrigliceridemia e conseqüentemente em resistência à insulina.

Os mecanismos propostos pelos pesquisadores para explicar o efeito da frutose em promover resistência à insulina são:

- Hiperatividade do sistema simpático (VERMA et al., 1999);
- Disfunção endotelial por diminuição na produção de óxido nítrico (NAKAGAWA et al., 2006);
- Hiperatividade do sistema renina-angiotensina (RONCAL et al., 2009);
- Aumento da resistência à leptina (SHAPIRO et al., 2008).

Armutcu et al., (2005) ao estudarem ratos Wistar machos alimentados com frutose a 10% dissolvidas em água por 10 dias, observaram esteatose hepática macrovesicular e microvesicular sem qualquer inflamação e fibrose. Entretanto, Kawasaki et al., (2009) concluíram, em experiência com ratos, que a dieta rica em frutose (60%) comparada à dieta rica em gorduras, corresponde ao melhor modelo de EHNA, com distribuição de inflamação lobular predominante sobre a portal, semelhante em humanos.

### **2.3 Hiperuricemia e esteato-hepatite não alcoólica**

Ácido úrico é o produto final da degradação das purinas nos mamíferos. Apesar de ocorrer a síntese e degradação de nucleotídeos purínicos em todos os tecidos, os uratos são apenas produzidos naqueles que contêm a enzima xantina oxidase que correspondem ao fígado e intestino delgado. A produção de uratos varia com o conteúdo de purinas da dieta e as taxas de síntese, degradação e excreção. Normalmente, 80-90% dos uratos são excretados pelos rins, sendo que o restante é eliminado por via intestinal. Hiperuricemia resulta do excesso de produção (hiperatividade da enzima xantina oxidase) ou da diminuição da excreção renal de ácido úrico (SO; THORENS, 2010).

Vários pesquisadores conduzindo estudos populacionais mostraram que elevações nas concentrações séricas de ácido úrico correspondem a um componente da síndrome metabólica. Em relação à síndrome metabólica e seus componentes, Yoo et al., (2005) em estudo conduzido na Coreia do Sul, envolvendo 53.477 pacientes determinaram uma correlação independente entre hiperuricemia com hipertensão arterial e resistência à insulina e classificou a hiperuricemia como um dos principais fatores de risco para síndrome metabólica. Pearlstein et al., (2006), ao realizarem um estudo de coorte longitudinal (Estudo Normativo do Envelhecimento), iniciado em 1963 pelo governo Americano, com 2280 homens na faixa etária entre 21 a 80 anos, concluíram que os níveis de ácido úrico  $> 6,5$  mg/dl é um fator de risco para desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica independente dos outros critérios para o diagnóstico da síndrome metabólica, função renal e idade. Lee et al., (1995), avaliando a inter-relação entre os fatores de riscos cardiovasculares e hiperuricemia em 886 homens, em estudo de coorte americano, constataram através de regressão multivariável que os níveis de ácido úrico estão positivamente associados com IMC ( $\beta = 0,041$  mg/dl por Kg/m<sup>2</sup>,  $p = 0,003$ ) e relação cintura/quadril ( $\beta = 1,88$  mg/dl por cm/cm,  $p = 0,048$ ). Lee et al., (2006), avaliaram 6.771 pacientes sem diabetes ou hipertensão arterial e constataram que a hiperuricemia esta

fortemente associado com microalbuminúria em pacientes com hipertensão arterial no limite superior (pressão arterial sistólica entre 120 e 140 mmHg e diastólica entre 80 e 90 mmHg).

Diversos pesquisadores conduzindo estudos nas últimas cinco décadas vêm correlacionando os níveis séricos elevados de ácido úrico como fator de risco para doenças cardiovasculares. Freedman et al.,(1995) demonstraram que cada acréscimo de 1 mg/dl nos níveis de ácido úrico está associado com aumento de 48% no risco para doenças coronarianas em mulheres. Iribarren et al., (1996), após avaliarem por ultrassom o índice de espessura de artérias carótidas (uma medida precoce de aterosclerose) em 6.522 mulheres e 4.966 homens com idade entre 45 a 64 anos, constataram que os níveis de ácido úrico correlacionaram-se positivamente em ambos os sexos, com vários fatores de risco para aterosclerose como IMC, níveis de triglicérides, insulina de jejum e hipertensão arterial, entretanto, não houve diferença significativa à associação de ácido úrico com o índice de espessura de artérias carótidas e Culleton et al., (1999), em estudo populacional, gerado a partir dos dados do estudo de coorte de Framingham, avaliaram 117.376 pessoas e concluíram que após ajuste para outros fatores de risco cardiovasculares, não houve correlação entre os níveis de ácido úrico e a ocorrência de eventos cardiovasculares.

Até o presente momento, poucas teorias tentam explicar o aumento da resistência à insulina promovida pela hiperuricemia. Nakagawa et al, (2005) sugerem que a hiperuricemia leva a resistência à insulina por disfunção endotelial por inibição na produção e biodisponibilidade endotelial de óxido nítrico. Ratos geneticamente modificados com deficiência de óxido nítrico apresentam resistência à insulina ao nível periférico (músculos esqueléticos), pois a ação da insulina nesses tecidos é dependente de óxido nítrico (NAKAGAWA, 2005).

Apesar da EHNA e hiperuricemia estarem fortemente relacionados com a síndrome metabólica, poucos pesquisadores na literatura associaram as duas patologias. Sakugawa et al., (2004) avaliaram a associação da gama-glutamil transferase com a síndrome metabólica e EHNA em 4211 mulheres japonesas e constataram como fatores de risco para esteatose hepática, níveis elevados de ácido úrico ( $\geq 7$  mg/dL) associado com hipertrigliceridemia ( $\geq 150$  mg/dl), hemoglobina  $\geq 14$  g/dL e IMC  $\geq 25$ . Lonardo et al, (2002), compararam valores bioquímicos de 60 pacientes com diagnóstico de EHNA com valores de indivíduos saudáveis (controle) e concluíram que elevação nos níveis de ácido úrico e insulina de jejum são preditores independentes de DHGNA e resistência à insulina.

Lee (2009) ao desenvolverem estudo transversal com uma amostra de 13.621 coreanos (7.221 homens e 6.400 mulheres) em tre 2005 e 2006, concluíram que a hiperuricemia (ácido

úrico > 7 mg/dl para homens e > 6 mg/dl para mulheres) está associado a EHNA, independentemente do IMC ou a presença da síndrome metabólica. Yamada et al., (2010) ao realizarem estudo longitudinal com 3076 mulheres e 1042 homens japoneses, avaliando fatores de riscos para EHNA, identificaram que o aumento progressivo do ácido úrico esta associado com aumento da prevalência de EHNA, independente da idade, IMC, hipertensão arterial, triglicerídeos, glicemia de jejum e tabagismo. Lee et al., 2010 examinaram a associação de hiperuricemia e EHNA em 3768 coreanos e determinaram que níveis de ácido úrico maiores que 4,5 mg/dl em mulheres e 6,4 mg/dl em homens duplica a chance do indivíduo desenvolver EHNA independente de outras variáveis.

Matsubara et al. (2002) avaliaram 822 mulheres Japonesas e constataram uma relação independente da adiposidade entre leptina e ácido úrico e Fruehwald-Schultes et al., (1999), ao compararem 59 pacientes com diabetes tipo 2 com 27 pacientes saudáveis (controle) e observaram associação entre níveis de leptina e ácido úrico independente da idade e IMC. Bedir et al., (2003), após avaliarem 420 pacientes turcos propuseram que a leptina seja um regulador da concentração do ácido úrico em pacientes obesos.

Dessa forma, a hiperleptinemia na obesidade aumentaria os níveis de ácido úrico, principalmente no fígado, pois o ácido úrico corresponde ao produto final da degradação das purinas, decorrente da biotransformação das xantinas promovidas pela enzima xantina-oxidase. A hipótese é que tanto a resistência à insulina como à resistência à leptina aumente a ação da xantina-oxidase. Pesquisadores apontam para a hiperprodução de radicais livres catalizados pela xantina-oxidase, principalmente superóxidos, induzindo disfunção mitocondrial e apoptose celular no fígado (JEON et al, 2001; RHODEON et al., 2000).

## **2.4 Alopurinol e esteato-hepatite não alcoólica**

Alopurinol foi introduzido pela primeira vez, em 1963, como um inibidor potente da enzima xantina oxidase (XO), quando foi investigado para uso concomitante com quimioterápicos para o câncer e tem sido utilizado por várias décadas para o tratamento de pacientes com hiperuricemia e gota. Estudiosos apontam para a hiperprodução de radicais livres catalizados pela xantina-oxidase, principalmente superóxidos, induzindo disfunção mitocondrial e apoptose celular no fígado (PACHER et al., 2006). Desde a introdução do conceito de lesão de isquemia-reperfusão na década de 80, no qual, após reversão de um evento isquêmico, a restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em um número de efeitos adversos (edema celular, disfunção endotelial, acúmulo intracelular de cálcio, bloqueio da

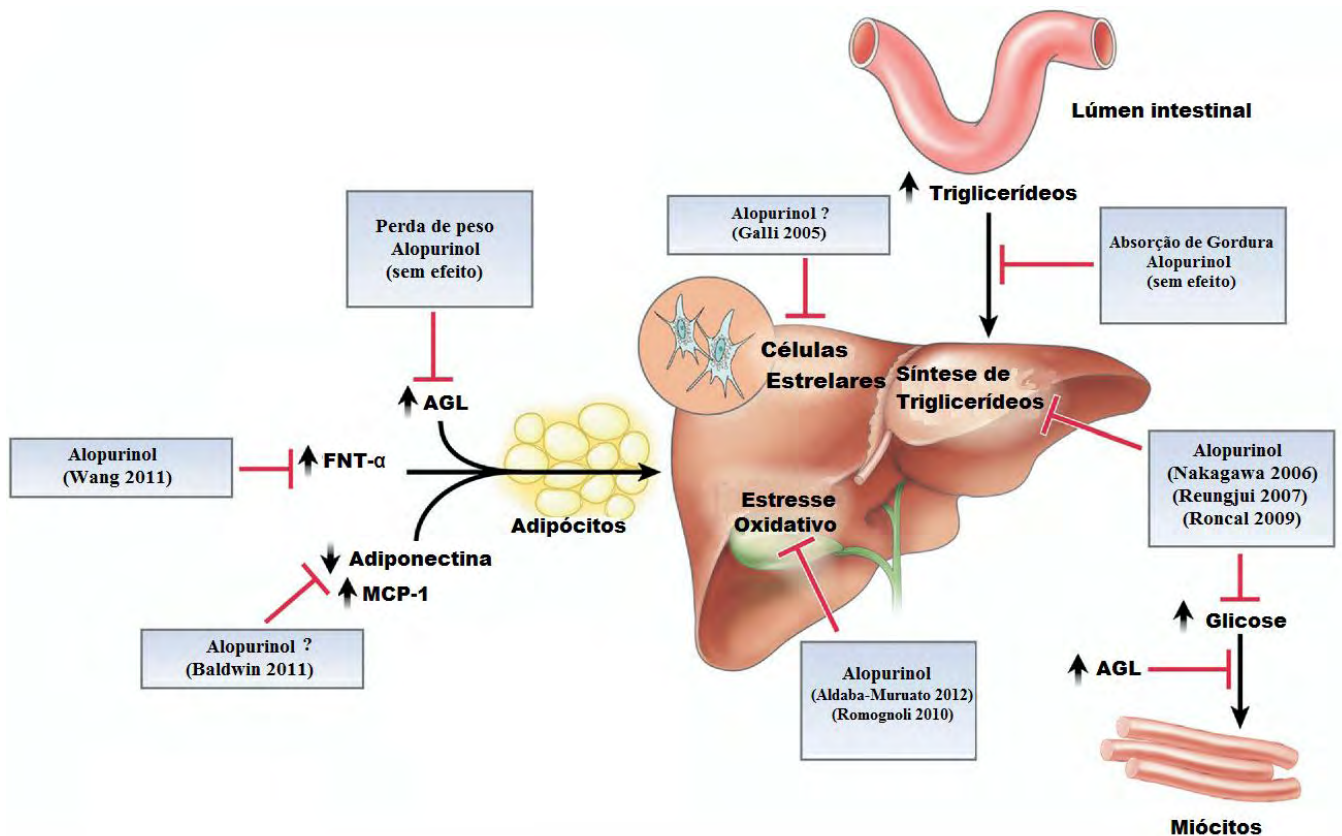
ação e adesão de neutrófilos e fibrose tecidual), várias linhas de evidências apoiam o papel da XO na geração de radicais livres e os efeitos benéficos dos inibidores da XO contra lesão isquêmica. Dessa forma, alopurinol vem sendo usado em inúmeras doenças que apresentem o estresse oxidativo como substrato inicial. (GRANGER et al., 1981, PACHER et al., 2006)

Em 2008, Hayashi et al, ao realizarem estudos com hamster TO-2 (modelo animal para distrofia muscular), concluíram que o uso do alopurinol por 6 a 12 semanas atenuou disfunção e dilatação de ventrículo esquerdo e diminuiu fibrose cardíaca. Recentemente, Jia et al., (2010) ao realizarem estudo experimental com ratos com hipertensão arterial induzido por uso subcutâneo de angiotensina II, constataram efeito antioxidante do alopurinol na prevenção da disfunção diastólica e fibrose cardíaca.

Nos últimos anos com relação à síndrome metabólica, o alopurinol vem sendo utilizado no tratamento da resistência à insulina e conseqüentemente as suas comorbidades. Nakagawa et al., (2005) ao realizarem experimento com ratos da linhagem Sprague-Dawley, induzindo resistência à insulina e hiperuricemia com dieta rica em frutose (60%) por 10 semanas e a administração de alopurinol (150 mg/l na água ofertada aos ratos) preveniram a resistência à insulina, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial e ganho de peso. Reungjui et al.,(2007) ao desenvolverem estudo com ratos para avaliar a ação do diurético hidroclorotiazida na promoção da resistência à insulina e hiperuricemia, associaram alopurinol e reposição de potássio ao tratamento e constataram melhora da resistência à insulina, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial. Perez-Pozo et al., (2009) ao efetuarem estudo clínico randomizado com o uso do alopurinol para tratamento da síndrome metabólica em 74 homens adultos após administração de 200 g de frutose por dia por 2 semanas constataram diminuição da pressão arterial e LDL-colesterol, entretanto não observaram melhora na resistência à insulina e nos níveis de triglicérides. Feig et al., (2008) ao realizarem estudo duplo cego, randomizado e placebo-controlado envolvendo 30 adolescentes com diagnóstico recente de hipertensão arterial essencial (estágio 1) e com níveis de ácido úrico superior a 6 mg/dl, observaram a redução dos níveis de pressão sistólica (-6,9 vs 0,8 mm Hg, P=0,001) e diastólica (-2,4 vs -0,3 mm Hg, P=0,04) com alopurinol 200mg/2x/dia.

Jeon et al., (2001) e Rhodeon et al., (2000) em pesquisa com ratos, submetidos à isquemia hepática temporária com posterior reperfusão e à administração profilática de alopurinol, demonstraram um efeito protetor na necrose hepatocelular, prevenindo o estresse oxidativo e a peroxidação de lipídios, fatores essenciais na patogênese da EHNA. Kono et al., (2000), ao realizarem experimento com ratos da linhagem Wistar, induziram hepatite

alcoólica com administração de 10-16 g/kg/dia de álcool e dieta rica em gordura por 4 semanas, concluindo que o uso do alopurinol preveniu injúria hepática com diminuição em 50% nos níveis das transaminases e infiltração neutrofílica no fígado e 60% no acúmulo de gordura, inflamação e necrose hepática. Até o presente momento, na revisão da literatura consultada, não se encontrou nenhum artigo utilizando o alopurinol ou outro inibidor da XO como tratamento específico da EHNA.



**Figura 6** - Os potenciais efeitos fisiopatológicos do alopurinol na EHNA. **Fonte:** Adaptado de Torres e Harrison (2008).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta proposta constitui-se de uma pesquisa pré-clínica experimental do tipo controlada e randomizada, onde a amostra foi distribuída aleatoriamente. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (CEPA – LTF/UFPB).

#### 3.1 Animais

O estudo foi realizado com 45 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com idade de 60 dias, pesando entre 200 e 250 gramas, divididos em três grupos de 15 ratos. O projeto foi desenvolvido no biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros (LTF) da UFPB

O número de ratos foi estimado pela média de animais utilizados em experimentos com protocolos semelhantes ao do presente estudo o qual, foi pesquisado o uso de novas medicações no tratamento de esteato-hepatite não alcoólica induzida pela ingestão de frutose em altas doses. (COUNTURIER et al.,2011; RONCAL et al.,2009; SHARABI et al., 2007)

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, cinco animais por gaiola, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo pellets (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola.

#### 3.2 Dieta e drogas

Neste estudo experimental, a doença hepática gordurosa foi induzida pela administração de água destilada *ad libidum* compostas por 20% de frutose, onde para cada 1 litro de água, foi adicionado 200 g de frutose pura. A frutose líquida foi ofertada no início do terceiro mês de vida dos ratos, durante 14 semanas.

Com relação à ração comercial ofertada aos ratos, sua composição, segundo as informações do fabricante (Purina® - Presence Ratos e Camundongos), é de, aproximadamente, 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibras e 12% de minerais. Os teores de sais minerais, fibras, proteínas, carboidratos e lipídios estão equilibrados segundo as recomendações de Reeves Nielsen e Fahey (1993) do American Institute of Nutrition – AIN.

A ingestão alimentar e hídrica foi cuidadosamente monitorada diariamente durante todo o período experimental através da mensuração da diferença entre a ofertada ao animal e o que sobrou da mesma.

A dose do alopurinol administrada aos ratos foi de 30mg/kg/dia (SUZUKI et al. 1984). A dose foi administrada por gavagem.

### **3.3 Procedimento experimental**

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um com 15 ratos:

- Grupo 1 (grupo F) receberam frutose e não foi administrado alopurinol: 15 ratos alimentados com água rica em frutose (20%) por 14 semanas
- Grupo 2 (grupo F + A) receberam frutose sendo administrado alopurinol: 15 ratos alimentados com água rica em frutose (20%) e alopurinol (30 mg/kg/dia) durante 14 semanas
- Grupo 3 (grupo C): Grupo controle: 15 ratos alimentados com água destilada sem frutose e não foi administrado alopurinol durante 14 semanas

Todos os animais foram pesados semanalmente em balança (Ohaus – Galaxy- 400), com construção de uma curva ponderal do peso.

### **3.4 Coleta dos materiais e morte dos animais**

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob efeito de anestesia com solução de cloridrato de xilazina como pré-anestésico e em seguida ketamina base a 2%, administrando-se 1 ml/1000g por via intraperitoneal, 48 horas após a última avaliação in vivo e após jejum de uma noite e em repouso, para retirada do sangue por punção cardíaca e obtenção do soro.

O sangue foi retirado por punção cardíaca com seringa de 10 mL e agulha 25x7, sendo o material acondicionado em tubos para sorologia, contendo uma barreira de gel no fundo do tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Durante a centrifugação, a barreira estável, separa o soro dos outros componentes celulares. As dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente. Enquanto que o soro restante foram armazenado em tubos eppendorf e mantidos em freezer -80°C, para a posterior realização de dosagem.

Para análise bioquímica foi utilizado um analisador bioquímico automatizado (Cobas Mira Roche®). Kits de diagnóstico padrão da Labtest® foram utilizados para avaliação espectrofotométrica dos seguintes parâmetros bioquímicos:

- Glicose
- Ácido úrico
- Aspartato aminotransferase
- Albumina
- Lipidograma (colesterol total e frações e triglicerídeos)
- Magnésio e potássio
- Creatinina

O fígado, rins e coração ,foram removidos, pesados, e preservados em formalina tamponada e em seguida, processados em parafina (microtécnica padrão). Os fígados dos ratos foram seccionados e colocado em fixador de Bouin (solução composta por ácido pícrico, formol e ácido acético), permanecendo nessa solução por aproximadamente 4 horas, para então ser lavado em água corrente. Subsequentemente, o material foi transferido para frascos com álcool a 50%, onde permaneceu por 30 minutos. Por último, os fígados foram armazenados em frascos com álcool a 70%, aguardando o processo para inclusão em parafina. Os tecidos foram seccionados a cada 5 mm e então fixados e corados com Hematoxilina-Eosina.

### **3.5 Análise histológica**

Inicialmente, foi realizado estudo macroscópico dos fígados retirados. Para a avaliação microscópica, os fígados foram processados em histotécnico e, subsequentemente, incluídos em parafina. Foi obtido 1 bloco de parafina de cada animal, para posterior microtomia, com espessura de 3 µm e fixação em lâminas de vidro. As lâminas dos fragmentos hepáticos foram coradas com hematoxilina-eosina, picro-sirius, para avaliação do grau de fibrose, e Perls, para avaliação da presença de depósitos de ferro. O estudo das lâminas foi do tipo fechado, cego, evitando-se viés de leitura, tendo sido examinadas por um único patologista.

O critério histológico mínimo para o diagnóstico de EHNA foi a presença de esteatose associada à balonização hepatocelular, envolvendo a zona 3 e infiltrado inflamatório lobular. Os corpúsculos de Mallory e a fibrose sinusoidal, envolvendo a zona 3, podem ou não estar presente.

Na análise histológica, foram determinados e quantificados os seguintes aspectos:

- esteatose macrovesicular;
- esteatose microvesicular;
- balonização hepatocelular;
- inflamação porta;
- inflamação lobular;
- corpúsculos de Mallory;
- depósitos de ferro;
- fibrose/cirrose.

Esses dados histológicos foram classificados em ausente, leve, moderado ou acentuado, de acordo com sua intensidade.

A esteatose foi considerada leve quando atingiu até 1/3 do lóbulo hepático; moderada, quando foi encontrada em 1/3 a 2/3 do lóbulo hepático e acentuada, quando presente em mais de 2/3 do lóbulo hepático.

Para determinar o grau da inflamação do espaço porta (leve, moderado ou acentuado), foi considerado o número de espaços porta comprometidos e a presença de atividade em cada espaço porta.

A determinação do grau de inflamação lobular (leve, moderado ou acentuado) foi realizada de acordo com o tipo de infiltrado e a intensidade do mesmo.

A balonização hepatocelular também foi quantificada em leve, moderada ou acentuada de acordo com sua intensidade e localização e baseada no número de hepatócitos que apresentou esta alteração.

Então, de acordo com a presença e a intensidade destes achados, foi realizado o diagnóstico de esteato-hepatite não alcoólica bem como determinado o escore da atividade necroinflamatória e o escore da fibrose:

- Atividade necroinflamatória:
  - a) grau 1: esteatose envolvendo no máximo 66% da amostra; leve balonização hepatocelular na zona 3; presença de polimorfonucleares no parênquima hepático com ou sem linfócitos; com inflamação portal ausente ou leve;
  - b) grau 2: esteatose de qualquer grau; balonização hepatocelular moderada

(predominante na zona 3); presença de polimorfonucleares no parênquima hepático os quais podem estar associados a fibrose pericelular na zona 3; infiltrado inflamatório portal e lobular considerado leve a moderado;

c) grau 3: esteatose panacinar; balonização hepatocelular acentuada (predominante na zona 3); infiltrado inflamatório lobular às custas de polimorfonucleares; infiltrado inflamatório portal leve ou moderado.

- Escore de fibrose:

a) estágio 1: fibrose perisinusoidal e/ou pericelular na zona 3;

b) estágio 2: fibrose perisinusoidal e/ou pericelular na zona 3 com septos ou pontes fibrosas porta incompletas;

c) estágio 3: presença de septos completos, porta-porta ou porta-centrolobular;

d) estágio 4: cirrose.

A graduação, tanto da atividade necroinflamatória como da fibrose, foi realizada segundo a classificação proposta por Brunt e colaboradores em 1999.

### **3.6 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Utilizou-se análise de variância para comparações avaliadas dentre os diferentes grupos. Quando era constatada diferença significativa entre as médias, foi utilizado o teste de Turkey para identificar quais grupos diferiram entre si. Nas variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney. O nível de significância de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.00 (2003).

## REFERÊNCIAS

- ABDELMALEK, M. F.; ANGULO, P.; JORGENSEN, R. A.; SYLVESTRE, P. B.; LINDOR, K. D. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. **The American Journal of Gastroenterology**. V.96, p. 2711-2717, 2001.
- ABDELMALEK, M. F.; SANDERSON, S. O.; ANGULO, P.; SOLDEVILA-PICO, C.; LIU, C.; PETER, J.; KEACH, J. C.; CAVE, M.; CHEN, T.; MCCLAIN, C. J.; LINDOR, K. D. Betaine for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Results of a Randomized Placebo-Controlled Trial. **Hepatology**, v.50, p.1818-1826, 2009.
- ANDERSEN, T.; GLUUD, C.; FRANZMANN, M. B.; CHRISTOFFERSEN, P. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. **Journal of Hepatology**, v.12, p.224-229, 1991.
- ANGULO, P., KEACH, J. C., BATTS, K. P. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**; v.30, p.1356-1362, 1999.
- ANGULO, P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. **Current Gastroenterology Reports**, v.4, p.37-44, 2002.
- ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p.1221-1231, 2002.
- ARMUTCU, F.; COSKUN, O.; GUREL, A.; KANTER, M.; UCAR, F.; UNALACAK, M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose induced steatohepatitis in rats. **Clinical Biochemistry**. v.38, p.540-547, 2005.
- BACON, B. R.; FARAHVASH, M. J.; JANNEY, C. G.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Nonalcoholic steatohepatitis: An expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v.107, p.1103-1109, 1994.
- BANTLE, J. P.; RAATZ, S. K.; THOMAS, W.; GEORGOPOULOS, A. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.72, p.1128-1134, 2000.
- BARCHETTA, I.; ANGELICO, F. DEL BEN, M.; BARONI, M. G.; POZZILLI, P.; MORINI, S.; CAVALLO, M. G. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. **BMC Medicine**, v.12, p.89-95, 2011.
- BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & Metabolism**, v.2, p.1-14, 2005.
- BEDIR, A.; TOPBAS, M.; TANYERI, F.; ALVUR, M.; ARIK, N. Leptin might be a regulator of serum uric acid concentrations in humans. **Japanese Heart Journal**, v.44, n.4, p.527-536, 2003.
- BEDOGNI, G.; BELLENTANI, S. Fatty liver: How frequent is it and why? **Annals of Hepatology**, V.3, p.63-65, 2004.

BEDOGNI, G.; MIGLIOLI, L.; MASSUTI, F.; TIRIBELLI, C.; MARCHESINI, G.; BELLENTANI, S. Prevalence of and Risk Factors for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Dionysos Nutrition and Liver Study. **Hepatology**, v.42, p. 44-52, 2005.

BEZERRA, R. M. N.; UENO, M.; SILVA, M. S.; TAVARES, D. Q.; CARVALHO, C. R. O.; SAAD, M. J. A.; GONTIJO, J. A. R. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.1155-1160, 2001

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.79, p.537-543, 2004.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v.89, p. 331-340, 1999.

BROWNING, J. D., HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.147-152, 2004.

BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BACON, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.2467-2474, 1999.

BUGIANESI, E.; GENTILCORE, E.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; DAVID, E.; RIZZETTO, M.; MARCHESINI, G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v.100(5), p.1082-1090, 2005

CAPANNI, M.; CALELLA, F.; BIAGINI, M. R.; GENISE, S.; RAIMONDI, L.; BEDOGNI, G.; SVEGLIAT-BARONI, G.; SOFI, F.; MILANI, S.; ABBATE, R.; SURRENTI, C.; CASINI, A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p.1143-1151, 2006.

CHEUNG, O.; SANYAL, A. J. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.26, p. 202-208, 2010.

CHITTURI, S., ABEYGUNASEKERA, S., FARREL, G.; HOLMES-WALKER, J.; HUI, J. M.; FUNG, C.; KARIM, R.; LIN, R., SAMARASINGHE, D.; LIDDLE, C.; WELTMAN, M.; GEORGE, J. Nash and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. **Hepatology**, v.35, n.2, p.373-378, 2002.

CRESPO, J.; CAYON, A.; FERNANDEZ-GIL, P.; HERNANDEZ-GUERRA, M.; MAYORGA, M.; DOMINGUEZ-DIEZ, A.; FERNANDEZ-ESCALANTE, J. C.; PONS-ROMERO, F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. **Hepatology**, v.34, n.6, p.1158-1163, 2001

COUTURIER, K.; QIN, B.; BATANDIER, C.; AWADA, M.; HININGER-FAVIER, I.; CANINI, F.; LEVERVE, X.; ROUSSEL, A. M.; ANDERSON, R. A. Cinnamon increases

liver glycogen in an animal model of insulin resistance. **Metabolism**, v.60, n.11, p.1590-1597, 2011.

CULLETON, B. F.; LARSON, M. G.; KANNEL, W. B.; LEVY, D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart Study. **Annals of Internal Medicine**, v.131, p.7-13, 1999.

DAI, S.; MCNEIL, J. H.; Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.33, p.101-107, 1995

DAY, C.P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. **Gastroenterology**, v.114, p.842-845, 1998

DEGUTI, M. M.; SIPAHI, A. M.; GAYOTTO, L. C.; PALÁCIOS, S. A.; BITTENCOURT, P. L.; GOLDBERG, A. C.; LAUDANNA, A. A.; CARRILHO, F. J.; CANÇADO, E. L. Lack of evidence for the pathogenic role of iron and HFE gene mutations in Brazilian patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.36, p.739-745, 2003.

DÍEZ, J. Review of the molecular pharmacology of Losartan and its possible relevance to stroke prevention in patients with hypertension. **Clinical Therapeutics**, v.28, n.6, p.832-848, 2006.

ELIOTT, S. S.; KEIM, N. L.; STERN, J. S.; TEFF, K.; HAVEL, P. J. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.911-922, 2002

FEIG, D. I.; SOLETSKY, B.; JOHNSON, R. J. Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. **JAMA**, v.300, p.924-932, 2008.

FERNANDEZ-MIRANDA, C.; PÉREZ-CARRERAS, M.; COLINA, F.; LÓPEZ-ALONSO, G.; VARGAS, C.; SOLÍS-HERRUZO, J. A. A pilot trial of fenofibrate for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive and Liver Disease**, v.40, p.200-205, 2008.

FREEDMAN, D. S.; WILLIAMSON, D. F.; GUNTER, E. W.; BYERS, T. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. **American Journal of Epidemiology**, v.141, p.637-644, 1995

FROMENTY, B.; ROBIN, M. A.; IGOUDJIL, A.; MANSOURI, A.; PESSAYRE, D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. **Diabetes and Metabolism**, v.30 p.121-138, 2004

FRUEHWALD-SCHULTES, B.; PETERS, A.; KERN, W.; BEYER, PFUTZER, A. Serum leptin is associated with serum uric acid concentrations in humans. **Metabolism**, v.48, n.6, p.677-680, 1999

GRANGER, D. N.; RUTILI, G.; MCCORD, J. M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, v.81, p.22-29, 1981

HALFORD, J. C.; BOYLAND, E. J.; LAWTON, C. L.; BLUNDELL, J. E.; HARROLD, J. A. Serotonergic anti-obesity agents: past experience and future prospects. **Drugs**, v.71, p.2247-2255, 2011.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **The FASEB Journal**. v.4, p.2652-2660, 1990.

HARRISON, S. A.; TORGERSON, S.; HAYASHI, P.; WARD, J.; SCHNKER, S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **The American Journal of Gastroenterology**, v.98, n.11, p.2485-2490, 2003.

HARRISON, S. A.; FECHT, W.; BRUNT, E. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. **Hepatology**, v.49, p.80-86, 2009.

HASEGAWA, T.; YONEDA, M.; NAKAMURA, K.; MAKINO, I.; TERANO, A. Plasma transforming growth factor-b1 level and efficacy of  $\alpha$ -tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 15, p 1667-1672, 2001.

HAVEL, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutrition Reviews**, v.63, p.133-157, 2005

HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. **Current Opinion in Lipidology**, v.10, p.143-150, 1999

HAYASHI, K.; KIMATA, H.; OBATA, K.; MATSUSHITA, A.; FUKATA, A.; HASHIMOTO, K.; NODA, A.; IWASE, M.; KOIKE, Y.; YOKOTA, M.; NAGATA, K. Xanthine oxidase inhibition improves left ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathic hamsters. **Journal of Cardiac Failure**, v.14, n.3, p.238-244, 2008.

HUNDAL, R. S.; INZUCCHI, S. E. Metformin: new understandings, new uses. **Drugs**, v.63, p.1879-1894, 2003

HUSSEIN, O.; GROSOVSKI, M.; LASRI, E.; SVALIB, S.; RAVID, U.; ASSY, N. Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content in non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, p.361-368, 2007.

HUSSEIN, O.; GROSOVSKI, M.; SCHLESINGER, M.; SZVALB, S.; ASSY, N. Orlistat reverse fatty infiltration and improves hepatic fibrosis in obese patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). **Digestive Diseases and Science**, v.52, p.2512-2519, 2007.

HWANG, I. S.; HOFFMAN, B. B.; REAVEN, G. M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-516, 1987

HYOGO, H.; IKEGAMI, T.; TOKUSHIGE, K.; HASHIMOTO, E.; INUI, K.; MATSUZAKI, Y.; TOKUMO, H.; HINO, F.; TAZUMA, S. Efficacy of pitavastatin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis with dyslipidemia: An open-label, pilot study. **Hepatology research**, v.41, p.1057-1065,2011.

IRIBARREN, C.; FOLSOM, A. R.; ECKFELDT, J. H.; MCGOVERN, P. G.; NIETO, F. J. Correlates of uric acid and its association with asymptomatic carotid atherosclerosis: the ARIC Study. *Atherosclerosis Risk in Communities*. **Annals of Epidemiology**, v.6, p.331-340, 1996.

GARINIS, G. A.; FRUCI, B.; MAZZA, A.; DE SIENA, M.; ABENAVOLI, M.; GULLETTA, E.; VENTURA, V.; GRICO, M.; ABENAVOLI, L.; BELFIORE, A. Metformin versus dietary treatment in nonalcoholic hepatic steatosis: a randomized study. **International Journal of Obesity** v.34, p.1255-1264, 2010

JEON, B. R.; YEOM, D. H.; LEE, S. M. Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. **Shock**, v.15, n.2, p.112-117, 2001

JIA, N., DONG, P., YE, Y., QIAN, C., DAI, Q. Allopurinol Attenuates Oxidative Stress and Cardiac Fibrosis in Angiotensin II-Induced Cardiac Diastolic Dysfunction. **Cardiovascular Therapeutics**, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-5922.2010.00243.x/full>, 2010.

JOHNSON, R. J.; SEGAL, M. S.; SAUTIN, Y.; NAKAGAWA, T.; FEIG, D. I.; KANG, D. H.; GERSCH, M. S.; BENNER, S.; SANCHEZ-LOZADA, L. G. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, V.86, P.899-906, 2007.

JOSEPH, A. E.; SAVERYMUTTU, S. H.; AL-SAM, S.; COOK, M. G.; MAXWELL, J. D. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. **Clinical of Radiology**, v.43, p.26-31, 1991.

KAYANIYIL, S.; VIETH, R.; RETNAKARAN, R.; KNIGHT, J. A.; QI, Y.; GERSTEIN, H. C.; PERKINS, B. A.; HARRIS, S. B.; ZINMAN, B.; HANLEY, A. J. Association of vitamin D with insulin resistance and beta-cell dysfunction in subjects at risk for type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, p.1379-1381, 2010.

KAWASAKI, T.; IGARASHI, K.; KOEDA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAGAWA, K.; HAYASHI, S.; YAMAJI, R.; INUI, H.; FUKUSATO, T.; YAMANOUCHI, T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. **The Journal of Nutrition**, v.139, n.11, p 2067-2071, 2009.

KELLEY, G. L.; ALLAN, G.; AZHAR, G. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinology**, v.145, p.548-555, 2004.

KERN, P. A.; SAGHIZADEH, M.; ONG, J. M.; BOSCH, R. J.; DEEM, R.; SIMSOLO, R. B. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. **The Journal of Clinical Investigation**, v.95, n.5, p.2111-2119, 1995.

LÊ, K, ITH, M.; KREIS, R.; FAEH, D.; BORTOLOTTI, M.; TRAN, C.; BOESCH, C.; TAPPY, L. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in

healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.1760-1765, 2009.

KIMURA, Y.; HYOGO, H.; YAMAGISHI, S.; TAKEUCHI, M.; ISHITOBI, M.; NABESHIMA, Y.; ARIHIRO, K.; CHAYAMA, K. Atorvastatin decreases serum levels of advanced glycation endproducts (AGEs) in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients with dyslipidemia: clinical usefulness of AGEs as a biomarker for the attenuation of NASH. **Journal of Gastroenterology**, v.45, p.750-757, 2010.

KONO, H.; RUSYN, I.; BRADFORD, B. U.; CONNOR, H. D.; MASON, R. P.; THURMAN, R. G. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.293, p.296-302, 2000.

KOGUT, M. D.; ROE, T. F.; NG, W.; NONNEL, G. N. Fructose-induced hyperuricemia: observations in normal children and in patients with hereditary fructose intolerance and galactosemia. **Pediatric Research**, v.9, p.774-778, 1975.

KUGELMAS, M.; HILL, D. B.; VIVIAN, B.; MARSANO, L.; MCCLAIN, C. J. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. **Hepatology**, v.38, p.413-419, 2004.

LAURIN, J.; LINDOR, K. D.; CRIPPIN, J. S.; GOSSARD, A.; GORES, G. J.; LUDWIG, J.; REKELA, J.; MCGILL, D. B. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. **Hepatology**, v.23, p.1464-1467, 1996.

LAZO, M.; SOLGA, S. F.; HORSKA, A.; BONEKAMP, S.; DIEHL, A. M.; BRANCATI, F. L.; WAGENKNECHT, L. E.; PI-SUNYER, F. X.; KAHN, S. E.; CLARK, J. M. Fatty Liver Subgroup of the Look AHEAD Research Group. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.33, p.2156-2163, 2010.

LEE, J.; SPARROW, D.; VOKONAS, P. S.; LANDSBERG, L.; WEISS, S. T. Uric acid and coronary heart disease risk: evidence for a role of uric acid in the obesity-insulin resistance syndrome. The Normative Aging Study. **American Journal of Epidemiology**, v.142, p.288-294, 1995

LEE, J. E.; KIM, Y. G.; CHOI, Y. H.; HUH, W.; KIM, D. J.; OH, H. Y. Serum uric acid is associated with microalbuminuria in prehypertension. **Hypertension**. V.47, n.5, p.962-967, 2006.

LEE, K. Relationship between uric acid and hepatic steatosis among Koreans. **Diabetes and Metabolism**. V.35, p.447-451, 2009

LEE, Y. J.; LEE, H. R.; LEE, J. H.; SHIN, Y. H.; SHIM, J. Y. Association between serum acid and non-alcoholic fatty disease in Korean adults. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. V.2, p.201-205, 2010.

LEE, Y. M., SUTEDJA, D. S.; WAI, C. T.; DAN, Y. Y.; AUNG, M. O.; ZHOU, L.; CHENG, C. L.; WEE, A.; LIN, S. G. A randomized controlled pilot study of Pentoxifylline in patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Hepatology International**, v.2, p. 196-201, 2008.

LONARDO, A.; LORIA, P.; LEONARDI, F.; BORSATTI, A.; PULVIRENT, M.; VERRONE, A. M.; BAGNI, A.; BERTOLOTTI, M.; GANAZZI, D.; CARULLI, N.. Fasting insulin and uric acid levels but not indices of iron metabolism are independent predictors of non-alcoholic fatty liver disease. A case-control study. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.3, p.204-211, 2002

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; MCGRILL, D. B., OH, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v.55 p.434-438, 1980.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; MORSELLI-LABATE, A.; BIANCHI, G.; BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **The American Journal of Medicine**, v.10, p.450-455, 1999.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; BIANCHI, G.; TOMASSETI, S.; BUGIANESI, E.; LENZI, M.; MCCULLOUGH, A. J.; NATALE, S.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, n.8, p.1844-1850, 2001.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R.; NATALE, S.; VANNI, E.; VILLANOVA, N.; MELCHIONDA, N.; RIZZETO, M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v.37, n.4, p.917-923, 2003.

MARTENS, F.; VISSEREN, F. L. J.; LEMAY, J.; KONING, E. J. P.; RABELINK, T. J. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. **Drugs**, v.62, p.1463-1480, 2002.

MARTINEZ-HERVAS, S.; REAL, J. T.; IVORRA, C.; PRIEGO, A.; CHAVES, F. J.; PALLARDO, F. V.; VINÁ, J. R.; REDON, J.; CARMENA, R.; ASCASO, J. F. Increased plasma xanthine oxidase activity is related to nuclear factor kappa beta activation and inflammatory markers in familial combined hyperlipidemia. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. V.9, p.2-4, 2009

MATSUBARA, M.; CHIBA, H.; MARUOKA, S.; KATAYOSE, S. Elevated serum leptin concentrations in women with hyperuricemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.9, n.1, p.28-34, 2002

MATTEONI, C. A.; YOUNOSSI, Z. M.; GRAMLICH, T.; BOPARAI, N.; LIU, Y. C.; MCCULLOUGH, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**. V.116, p.1413-1419.

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **The FASEB Journal**, v.13, p.995-1006, 1999

MCCUSKEY, R. S.; ITO, Y.; ROBERTSON, G. R.; MCCUSKEY, M. K.; PERRY, M.; FARRELL, G. C. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. **Hepatology**, v.40, p.386-393, 2004.

MCKEAGE, K.; KEATING, G. M. Fenofibrate: a review of its use in dyslipidaemia. **Drugs**, v.71, p.1917-1946, 2011.

MEDINA, J.; SALAZAR, L. I. F.; BUEY, L. G.; OTERO, R. M. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Diabetes Care**, v.27, p.2057-2065, 2004.

MIYAZAKI, Y. MAHANKALI, A.; WAJCBURG, E.; BAJAJ, M.; MANDARINO, L. J.; DEFRONZO, R. A. Effect of pioglitazone on circulating adipocytokine levels and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89 p.4312-4309, 2004.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; De MICHIELI, F.; CASSADER, M.; RIZZETTO, M.; FAGA, E.; SILLI, B.; PAGANO, G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v.37, p.909-916, 2003.

NAKAGAWA, T.; HU, H.; ZHARIKOV, S.; KATHERINE, R. T.; SHORT, R. A.; GLUSHAKOVA, O.; OUYANG, X.; FEIG, D. I.; BLOCK, E. R.; ACOSTA, J. H.; PATEL, J. M.; JOHNSON, R. J. A causal role for uric in fructose-induced metabolic syndrome. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v.290, p.F625-631, 2005.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BRUNT, E. M.; WEHMEIER, K. R.; OLIVER, D.; BACON, B. R. Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone. **Hepatology**, v.38, p.1008-1017, 2003.

OLIVEIRA, E. P.; SOUZA, M. L. A.; LIMA, M. D. A. HOMA (homeostasis model assessment) index in clinical practice: a review. *Bras Patol Med Lab.* v. 41, p. 237-243, 2005.

PACHER, P.; NIVOROZHKIN, A.; SZABÓ, C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. **Pharmacological Reviews**, v.58, p.87-114, 2006

PAGANO, V.; PACINI, G.; MUSSO, G.; GAMBINO, R.; MECCA, F.; DEPETRIS, N.; CASSADER, M.; DAVID, E.; CAVALLO-PERIN, P.; RIZZETTO, M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. **Hepatology**, v.35, n.2, p.367-371, 2002.

PARK, Y. K.; YETLEY, E. A. Intakes and food sources of fructose in the United States. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.5, p.737-747, 1993.

PEREZ-POZO, S. E.; SCHOLD, J.; NAKAGAWA, T.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; JOHNSON, R. J.; LILLO, J. L. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. **International Journal of Obesity**, v.34, n.3, p.454-461, 2009

- PERLSTEIN, T. S.; GUMIENIAK, O; WILLIAMS, G. H.; SPARROW, D.; VOKONAS, P. S.; GAZIANO, M.; WEISS, S. T.; LITONJUA, A. A. Uric acid and the development of hypertension the normative aging study. **Hypertension**. V.48, p.1031-1036, 2006
- PESSAYRE, D.; BERSON, A.; FROMENTY, B.; MANSOURI, A. Mitochondria in steatohepatitis. **Seminars in liver disease**, v.2, p.57-69, 2001.
- POLI, A. Atorvastatin: pharmacological characteristics and lipid-lowering effects. **Drugs**. V.67, p.3-15, 2007.
- POWELL, E. E.; COOKSLEY, W. G.; HANSON, R.; SEARLE, J.; HALLIDAY, J. W.; POWELL, L. W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. **Hepatology**, v.11, p.74-80, 1990.
- PROMRAT, K.; LUTCHMAN, G.; UWAIFO, G. I.; FREEDMAN, R. J.; SOZA, A.; HELLER, T.; DOO, E.; GHANY, M.; PREMKUMAR, A.; PARK, Y.; LIANG, T. J.; YANOVSKI, J. A.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v.39, n.1, p.188-196, 2004.
- PROMRAT, K.; KLEINER, D. E.; NIEMEIER, H. M.; JACKVONY, E.; KEARNS, M.; WANDS, J. R.; FAVA, J. L.; WING, R. R. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, V.51, p.121-129.
- QAYYUM, A; CHEN, D. M.; BREIMAN, R. S.; WESTPHALEN A. C.; YEH, B. M.; JONES, K. D.; LU, Y.; COAKLEY, F. V.; CALLEN, P. W. Evaluation of diffuse liver steatosis by ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging: which modality is best? **Clinical Imaging**, v.33, n.2, p.110–115, 2009
- RATZIU, V.; LEDINGHEN, V.; OBERTI, F.; MATHURIN, P.; WARTELLE-BLADOU, C.; RENOU, C.; SOGNI, P.; MAYNARD, M.; LARREY, D.; SERFATY, L.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BASTARD, J. P.; RIVIÈRE, M.; SPÉNARD, J.; FRESGUN. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Hepatology**, v.54, p.1011-1019, 2011.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents; final report of the American of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.10, p.1939-1951, 1993.
- REUNGJUI, S.; RONCAL, C. A.; MU, W.; SRINIVAS, T. R.; SIRIVONGS, D.; JOHNSON, R. J.; NAKAGAWA, T. Thiazide diuretics exacerbate fructose-induced metabolic syndrome. **Journal of The American Society of Nephrology**, v.18, p.2724-2731, 2007.
- RHODEON, E.; LIMA, L. P.; LUCAS, M.; MAURI, M.; RHODEN, C.; PEREIRA-LIMA, J. C.; PETTEFFI, L.; BELLÓ-KLEIN, A. The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. **European Surgical Research**, v.32, n.4, p.215-222, 2000
- RONCAL, C. A.; REUNGJUI, S.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; MU, W.; SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T.; JOHNSON, R. J. Combination of captopril and allopurinol retards

fructose-induce metabolic syndrome. **American Journal Nephrology**, v.30, n.5, p 399-404, 2009

ROZENTAL, P.; BIAVA, C.; SPENCER, H.; ZIMMERMAN, H. J. Liver morphology and function tests in obesity and during total starvation. **The American Journal of Digestive Diseases**, v.12, p.198-208, 1967.

SABUNCU, T.; NAZLIGUL, Y.; KARAOGLANOGLU, M.; UCAR, E.; KILIC, F. B. The effects of sibutramine and orlistat on the ultrasonographic findings, insulin resistance and liver enzyme levels in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Romanian Journal of Gastroenterology**, v.12, p. 189-192, 2003.

SAKUGAWA, H.; NAKAYOSHI, T.; KOBASHIGAWA, K.; NAKASONE, H.; KAWAKAMI, Y.; YAMASHIRO, T.; MAESHIRO, T.; TOMIMORI, K.; MIYAGI, S.; KINJO, F.; SAITO, A. Metabolic syndrome is directly associated with gamma glutamyl transpeptidase elevation in Japanese women. **World Journal Gastroenterology**, v.10, n.7, p.1052-1055, 2004.

SANYAL, A. J. CAMPBELL, S. C.; MIRSHANI, F.; RIZZO, W. B.; CONTOS, M. J.; STERLING, R. K.; LUKETIC, V. A.; SHIFFMAN, M. L.; CLORE, J. N. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**, v.120, p.1183-1192, 2001

SANYAL, A. J. MOFRAD, P. S.; CONTOS, M. J.; SARGEANT, C.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; STRAVITZ, R. T.; SHIFFMAN, M. L.; CLORE, J.; MILLS, A. S. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.2, p. 1107-1115, 2004.

SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; DIEHL, A. M.; BASS, N. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; LAVINE, J. E.; TONASCIA, J.; UNALP, A.; VAN NATTA, M.; CLARK, J.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H. ROBUCK, P. R.; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1675-1685, 2010.

SAMUEL, V. T.; LIU, Z. X.; QU, X.; ELDER, B. D.; BILZ, S.; BEFROY, D.; ROMANELLI, A. J.; SHULMAN, G. I. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.32345-32353, 2004.

SAMUHASANEETO, S.; THONG-NGAM, D.; KULAPUTANA, O.; PATUMRAJ, S.; KLAIKEAW, N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v.90, p. 788-797, 2007.

SASS, D. A.; CHANG, P.; CHOPRA, K.B. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. **Digestive Diseases and Sciences**, v.50, p.171-180, 2005.

SATAPATHY, S. K.; SAKHUJA, P.; MALHOTRA, V.; SHARMA, B. C.; SARIN, S. K. Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in

patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.22, n.5, p.634-638, 2007.

SAXENA, N. K.; IKEDA, K.; ROCKEY, D. C.; FRIEDMAN, S. L.; ANANIA, F. A. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and littermates of ob/ob mice. **Hepatology**, v.35, p.762-771, 2002

SCHUPP, M.; LEE, L. D.; FROST, N.; UMBREEN, S.; SCHMIDT, B.; UNGER, T.; KINTSCHER, U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. **Hypertension**, v.47, n.3, p.586-589, 2006.

SHARABI, Y.; ORON-HERMAN, M.; KAMARI, Y.; AVNI, I.; PELEG, E.; SHABTAY, Z.; GROSSMAN, E.; SHAMISS, A. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. **American Journal of Hypertension**, v.20, v.206-210, 2007.

SHAPIRO, A.; MU, W.; RONCAL, C.; CHENG, K. T.; JOHNSON, R. J.; SCARPACE, P. J. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.295, p.R1370-R1375, 2008.

SHETH, S. G.; GORDON, F. D.; CHOPRA, S. Nonalcoholic steatohepatitis. **Annals of Internal Medicine**. v.126, p.137-145, 1997.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.74, p.3028-3032, 1999.

SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R. E.; BASHMAKOV, Y.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular Cell**, v.6, p.77-86, 2000.

SO, A.; THORENS, B. Uric acid transport and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.6, p.1791-1799, 2010.

SOLGA, S.; ALKHURAISSHE, A. R.; CLARK, J. M.; TORBENSON, M.; GREENWALD, A.; DIEHL, A. M.; MAGNUSON, T. Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.49, p. 1578-1583, 2004.

SUZUKI, Y.; SUDO, J.; TANABE, T. Allopurinol toxicity: its toxic organ-specificity between the liver and the kidney in the rat. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.9, p.343-351, 1984.

TANAKA, N.; SANO, K.; HORIUCHI, A.; TANAKA, E.; KIYOSAWA, K.; AOYAMA, T. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, p.413-418, 2008.

TANIGUCHI, Y.; HAYASHI, T.; TSUMURA, K.; ENDO, G.; FUJILI, S.; OKADA, K. Serum uric acid and the risk for hypertension and Type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey. **Journal of Hypertension**, v.19, p.1209-1215, 2001.

- TARGHER, G.; BERTOLINI, L.; SCALA, L.; CIGOLINI, M.; ZENARI, L.; FALEZZA, G.; ARCARO, G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 17, p. 517-524, 2007.
- TORGERSON, J. S.; HAUPTMAN, J.; BOLDRIN, M. N.; SJOSTROM, L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. **Diabetes Care**. V.27, p.155-161, 2004.
- TORRES, D. M.; HARISSON, S. A. Diagnosis and Therapy of Nonalcoholic Steatohepatitis. **Gastroenterology**, v.134, p.1682-1698, 2008.
- TOSHIMITSU, K.; MATSUURA, B.; OHKUBO, I.; NIIYA, T.; FURUKAWA, S.; HIASA, Y.; KAWAMURA, M.; EBIHARA, K.; ONJI, M. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. **Nutrition**, v.23, p.46-52, 2007.
- VERMA, S.; BHANOT, S.; MCNEIL, J. H. Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v.373, p.R1-R4, 1999.
- VOS, M. B.; KIMMONS, J. E.; GILLESPIE, C.; WELSH, J.; BLANCK, H. M. Dietary Fructose Consumption Among US Children and Adults: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.89, p.1760-1765, 2009.
- WESTERBACKA, J.; LAMMI, K.; HAKKINEM, A. M.; RISSANEM, A.; SALMINEN, I.; ARO, A.; YKI-JARVINEN, H. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90(5), p.2804-2809, 2005.
- WIEZOREK, J. S.; BROWN, D. H.; KUPPERMAN, D. E.; BRASS, C. A. Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.94, p.2224-2230, 1994.
- YAMADA, T. SUZUKI, S.; FUKATSU, M., WADA, T.; YOSHIDA, T.; JOH, T. Elevated serum uric acid is an independent risk factor for nonalcoholic fatty liver disease in Japanese undergoing a health checkup. **Acta Gastroenterologica Belgica**, v.73, p.12-17, 2010.
- YOKOHAMA, S.; TONEDA, M.; HANEDA, M.; OKAMOTO, S.; YONEDA, M.; OKAMOTO, S.; OKADA, M.; ASO, K.; HASEGAWA, T.; TOKUSASHI, Y.; MIYOKAWA, N.; NAJAMURA, K. Therapeutic efficacy of an angiotensin II receptor antagonist in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v.40, n.5, p.1222-1225, 2004.
- YONEDA, M.; FUJITA, K.; NOZAKI, Y.; ENDO, H.; TAKAHASHI, H.; HOSONO, K.; SUZUKI, K.; MAWATARI, H.; KIRIKOSHI, H.; INAMORI, M.; SAITO, S.; IWASAKI, T.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, K.; MAEYAMA, S.; NAKAJIMA, A. Efficacy of ezetimibe for

the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: An open-label, pilot study. **Hepatology Research**, v.40, n.6, p.613-621, 2010.

YOO, T. W.; SUNG, K. C.; SHIN, H. S.; KIM, B. J.; KIM, B. S.; KANG, J. H.; LEE, M. H.; PARK, J. R.; KIM, H.; RHEE, E. J.; LEE, W. Y.; KIM, S. W.; RYU, S. H.; KEUM, D. G. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circulation Journal**, v.69, n.8, p.928-933, 2005.

ZELBER-SAGI, S.; NITZAN-KALUSKI, D.; GOLDSMITH, R.; WEBB, M.; BLENDIS, L.; HALPERN, Z.; OREN, R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. **Journal of Hepatology**, v.47, p.711-717, 2007.

ZELBER-SAGI, S.; RATZIU, V.; OREN, R. Nutrition and physical activity in NAFLD: An overview of the epidemiological evidence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p.3377-3389, 2011.

ZEIN, C. O.; YERIAN, L. M.; GOGATE, P.; LOPEZ, R.; KIRWAN, J. P.; FELDSTEIN, A. E.; MCCULLOUGH, A. J. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. **Hepatology**, v.54, p.1610-1619, 2011.



# PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL CERTIDÃO

João Pessoa, 29 de novembro de 2010

**CEPA Nº. 0308/10**

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadora: Profa. Dra. Maria José de Carvalho e Costa e Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Orientando(a): **FABYAN ESBERARD DE LIMA BELTRÃO**

Departamento/Setor: LTF

**Ref.: EFEITOS DO ALOPURINOL NO TRATAMENTO DA ESTEATOSE-HEPATITE NÃO ALCOÓLICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA RICA EM FRUTOSE**

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: **48 Ratos Wistar machos**

Período: **07/2010 até 01/2011.**

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

**ARTIGO****ALOPURINOL NA PREVENÇÃO DA ESTEATO-HEPATITE NÃO  
ALCOÓLICA E HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR DIETA RICA EM  
FRUTOSE EM RATOS WISTAR****ALLOPURINOL IN PREVENTING OF NONALCOHOLIC  
STEATOHEPATITIS AND HYPERGLYCEMIA INDUCED BY A  
FRUCTOSE-RICH DIET IN WISTAR RATS**

Artigo elaborado a partir da dissertação de mestrado do primeiro autor intitulado: Alopurinol na prevenção do desenvolvimento da esteato-hepatite não alcoólica e hiperglicemia induzida por dieta rica em frutose em ratos Wistar. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, campus I, João Pessoa, Paraíba, 2012.

**Periódico:** The Journal of Nutrition  
**Qualis:** A1 (Ano-Base- 2008)  
**Área:** Medicina II  
**ISSN:** 0022-3166  
**Fator de impacto:** 4,3 (JCR-2010)

**Alopurinol na prevenção da esteato-hepatite não alcoólica e hiperglicemia induzida por dieta rica em frutose em ratos Wistar.**

**Alopurinol in preventing of nonalcoholic steatohepatitis and hyperglycemia induced by a fructose-rich diet in Wistar rats.**

Fabyan Esberard de Lima Beltrão<sup>1</sup>, Maria José de Carvalho Costa<sup>2</sup>, Rosalia Gouveia Filizola<sup>3</sup>, José Eymard Moraes de Medeiros Filho<sup>4</sup>, Fabricia Elizabeth de Lima Beltrão<sup>5</sup>, Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão<sup>6</sup>, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz<sup>7</sup>, Alexandre Rolim da Paz<sup>4</sup>, Daniele Carvalhal de Almeida Beltrão<sup>5</sup>, Luciana da Silva Nunes Ramalho<sup>7</sup>, Thyago Marsicano Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E- mail: [fesberard@uol.com.br](mailto:fesberard@uol.com.br)

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. E- mail: [mjc.costa@terra.com.br](mailto:mjc.costa@terra.com.br).

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>4</sup> Hospital Universitário Lauro Wanderley, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade Ciências Médicas, Departamento de Medicina, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>6</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

<sup>7</sup> Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

\* Endereço para correspondência: Av. Desembargador Hilton Souto Maior, N.6701, quadra 754, lote 521, Portal do Sol, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

## ABSTRACT

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the last two decades has been recognized as the most common chronic liver disease in Western countries, paralleling the epidemic of obesity and consumption of high-fructose diet. Allopurinol, a potent inhibitor of xanthine oxidase, with anti-inflammatory and antioxidant effects has been shown to prevent the metabolic syndrome induced by fructose. Thus, the main objective of the study is to evaluate the effects of allopurinol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hyperglycemia in rats fed high-fructose water. Wistar rats were fed along with 20% fructose in drinking water with or without allopurinol (30mg/kg/day) for 14 weeks. A control group received a normal diet. Levels of serum total cholesterol ( $P<0,001$ ) and glucose ( $P<0,05$ ) in the fructose group and of triglycerides ( $P<0,01$ ) and creatinine ( $P<0,01$ ) in the allopurinol group were increased significantly compared with normal control. Liver histopathology from group fructose showed mild to moderate, steatosis, necroinflammation and fibrosis. Treatment with allopurinol decrease macrovesicular steatosis (27%,  $P<0,01$ ), necroinflammation (72%,  $P<0,001$ ) and fibrosis (26%,  $P<0,05$ ) in hepatocytes. Allopurinol therapy was effective in preventing necroinflammation and hepatic fibrosis fructose-induced, and thus the first study to prove the action of a xanthine oxidase inhibitor as a treatment for NASH.

**Words keys:** nonalcoholic steatohepatitis, hyperglycemia, allopurinol, fructose, Wistar rats.

## RESUMO

Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) nas últimas duas décadas tem sido reconhecida como a doença hepática crônica mais comum nos países ocidentais, em paralelo com a epidemia de obesidade e consumo de alto teor de frutose dieta. Alopurinol, um potente inibidor da xantina-oxidase, com efeito anti-inflamatório e antioxidante tem sido utilizado para prevenir a síndrome metabólica induzida por frutose. Assim, o objetivo principal do estudo é avaliar os efeitos do alopurinol no tratamento da esteatose hepática não alcoólica (EHNA) e hiperglicemia em ratos alimentados com água rica em frutose. Ratos Wistar foram alimentados com 20% de frutose na água de beber, com ou sem alopurinol (30mg/kg/dia) durante 14 semanas. Um grupo controle recebeu uma dieta normal. Níveis de colesterol total ( $P <0,001$ ) e glicose ( $P <0,05$ ) no grupo de frutose e de triglicérides ( $P <0,01$ ) e creatinina ( $P <0,01$ ) no grupo alopurinol foram significativamente mais elevados, em comparação com o controle normal. A análise histopatológica hepática do grupo frutose mostrou esteatose, necroinflamação e fibrose de leve a moderada. O tratamento com alopurinol diminuiu esteatose macrovesicular (27%,  $P <0,01$ ), necroinflamação (72%,  $P <0,001$ ) e fibrose (26%,  $P <0,05$ ) em hepatócitos. A terapia com alopurinol foi eficaz na prevenção da necroinflamação e fibrose hepática induzida por frutose, e, assim, corresponde ao primeiro estudo a provar a ação de um inibidor da xantina oxidase como um tratamento para EHNA.

Palavras chaves: esteatose hepática não alcoólica, hiperglicemia, alopurinol, frutose, ratos Wistar.

## INTRODUÇÃO

A DHGNA (doença hepática gordurosa não-alcoólica) é uma condição clínico-patológica caracterizada por um largo espectro de lesão hepática que varia de esteatose macrovesicular simples para esteatohepatite, fibrose avançada e cirrose (1-4). A DHGNA, nas últimas duas décadas, vem sendo reconhecida como a doença hepática mais comum nos países ocidentais e a prevalência na população geral é estimada em 20% a 30% (5). Vários estudiosos relataram que a resistência à insulina está presente na maioria dos pacientes com DHGNA, independente da coexistência da obesidade (6-9), sugerindo que DHGNA/EHNA possa ser a manifestação hepática da síndrome metabólica (10).

Nas últimas duas décadas, a prevalência de obesidade, síndrome metabólica e hiperuricemia vêm crescendo no mesmo ritmo que o consumo de alimentos ricos em frutose (11-13). Com relação à obesidade, a frutose pode levar a ganho de peso independente do gasto energético, com a sua possível participação direta no controle hipotalâmico da saciedade (14,15,16). Através de experimentos, principalmente com ratos, a resistência à insulina e hiperuricemia vêm sendo estimulada através da sobrecarga de frutose na dieta (17-20). Os mecanismos propostos pelos pesquisadores para explicar o efeito da frutose em promover resistência à insulina são: aumento da resistência à leptina (16), disfunção endotelial por diminuição na produção de óxido nítrico (20), hiperatividade do sistema simpático (21) e do sistema renina-angiotensina (22).

Elevações nos níveis séricos de ácido úrico estão associados com a obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e doenças cardiovasculares (23-26). A hiperuricemia é um achado prevalente em pacientes com síndrome metabólica, dessa forma, é dita como um dos principais componentes dessa síndrome (27), embora seu significado clínico ainda seja controverso e muitas vezes subestimado. Estudos recentes utilizando animais como cobaia têm chamado a atenção para outra perspectiva sobre a hiperuricemia, indicando que ela pode não ser apenas uma consequência de estados de resistência à insulina, mas também um preditor significativo do desenvolvimento da síndrome metabólica. (20, 28). Apesar da EHNA e hiperuricemia estarem fortemente relacionadas com a síndrome metabólica, poucos pesquisadores na literatura associaram as duas patologias (29-30).

Em relação ao tratamento da DHGNA, as estratégias terapêuticas no manejo desses pacientes visam apenas tratar as condições predisponentes associadas, como a obesidade, síndrome metabólica e dislipidemia. O perfil de eficácia e segurança da farmacoterapia no

tratamento da DHGNA ainda permanece incerto (31). Formas alternativas de tratamento para os pacientes com DHGNA vêm sendo investigadas e envolvem diminuição do estresse oxidativo, como anti-oxidantes (vitamina E, N-acetilcisteína e betaína) ou diminuição na produção de citocinas pró-fibróticas, como a pentoxifilina e ácido ursodesoxicólico (32-36).

Alopurinol, potente inibidor da enzima xantina oxidase (XO), tem sido utilizado por várias décadas para o tratamento de pacientes com hiperuricemia e gota. Estudiosos apontam para a hiperprodução de radicais livres catalisados pela XO, principalmente superóxidos, induzindo disfunção mitocondrial e apoptose celular no fígado (37). Nos últimos anos, pesquisadores vêm utilizando o alopurinol no tratamento da resistência à insulina e conseqüentemente as suas comorbidades (20). Até o presente momento, na revisão da literatura consultada, não se encontrou artigo utilizando o alopurinol ou outro inibidor da XO como tratamento específico da EHNA. Dessa forma, o objetivo principal do presente estudo é avaliar os efeitos do alopurinol na prevenção da esteato-hepatite não alcoólica e hiperglicemia induzida por dieta rica em frutose em ratos Wistar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado com 45 ratos machos Wistar, com idade de 60 dias, pesando entre 200 e 250 gramas, divididos e randomizados em três grupos de 15 ratos. O número de ratos foi estimado pela média de animais utilizados em experimentos com protocolos semelhante ao do presente estudo no qual foi pesquisado o uso de novas medicações na prevenção da esteato-hepatite não alcoólica induzida pela ingestão de frutose em altas doses. (22,38). Neste estudo experimental, a doença hepática gordurosa foi induzida pela administração de água destilada *ad libitum* compostas por 20% de frutose durante 14 semanas. A dose do alopurinol administrada por gavagem aos ratos foi de 30mg/kg/dia (39). O grupo controle (C) recebeu apenas dieta comercial (Purina®), o grupo frutose (F): dieta comercial e água com frutose (20%) e o grupo frutose mais alopurinol (F + A): dieta comercial, água com frutose (20%) e alopurinol. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno, cinco animais por gaiola, à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e ao alimento, sendo pesados semanalmente em balança (Ohaus – Galaxy- 400). O projeto foi desenvolvido no biotério Professor Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes Medeiros (LTF) e submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (CEPA – LTF/UFPB).

**Coleta dos materiais e parâmetros bioquímicos.** Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob efeito de anestesia com solução de cloridrato de xilazina como pré-anestésico e em seguida ketamina base a 2%, administrando-se 1 ml/1000g por via intraperitoneal, 48 horas após a última avaliação *in vivo* e após jejum de uma noite e em repouso, para retirada do sangue por punção cardíaca e obtenção do soro, além de órgãos como fígado, cérebro e rins. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos e as dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente. As dosagens de glicose, alanina e aspartato aminotransferase (ALT e AST), ácido úrico, albumina, colesterol total, LDL e HDL-colesterol e triglicérides foram realizadas utilizando-se o analisador bioquímico automatizado COBAS MIRA PLUS® - ROCHE. Os fígados foram removidos, pesados, e preservados em formalina tamponada e em seguida, processados em parafina, seccionados a cada 5 mm e fixados e corados com Hematoxilina-eosina, picro-sirius, para avaliação do grau de fibrose, e Perls, para avaliação da presença de depósitos de ferro. O estudo das lâminas foi do tipo fechado, cego, evitando-se viés de leitura, tendo sido examinadas por um único patologista.

**Avaliação histopatológica dos fígados.** O critério histológico mínimo para o diagnóstico de EHNA foi a presença de esteatose associada à balonização hepatocelular envolvendo a zona 3 e infiltrado inflamatório lobular. Na análise histológica, foram determinados os seguintes aspectos: esteatose macro e microvesicular, inflamação porta e lobular e fibrose e quantificados em graus baseado na percentagem de hepatócitos envolvidos na biopsia (0, nenhuma; 1, < 33%; 2, 33%-66%; 3, >66%). A graduação, tanto da atividade necroinflamatória como da fibrose, foi realizada segundo a classificação proposta por Brunt et al. (40).

**Análise estatística.** Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Utilizou-se análise de variância para comparações avaliadas dentre os diferentes grupos. Quando se constatava diferença significativa entre as médias, utilizava-se o teste de Turkey para identificar quais grupos diferiram entre si. Para variáveis não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney. O nível de significância de  $p < 0,05$  foi aceito

como estatisticamente significativo. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 4.00 (2003).

## RESULTADOS

### Peso corporal e biometria do tecido hepático

Observa-se na tabela 1 que os animais tratados com alopurinol apresentaram menor ganho de peso durante as 14 semanas de tratamento em relação aos animais não tratados com a droga, em especial, ao grupo controle, com diferença significativa e que a ingestão de frutose e o uso do alopurinol não alterou o peso final corporal e hepático dos animais.

**Tabela 1** Relação entre ganho de peso final e biometria do fígado dos grupos

	C	F	F + A
Ganho de peso (g)	125,1 ± 37,16	102,8 ± 29,08	73,6 ± 47,82 *
Peso final (g)	373,5 ± 38,5	353,3 ± 29,9	342,2 ± 38,45
Peso final do fígado	12,56 ± 0,58	13,21 ± 0,54	11,58 ± 0,79
Biometria (g/100g) do fígado	3,4 ± 0,76	3,75 ± 0,55	3,53 ± 0,82

C (Grupo Controle), F (Grupo Frutose), F + A (Grupo Alopurinol). Os valores representam a média ± desvio padrão. \*P<0,001 vs C

### Parâmetros laboratoriais

A concentração plasmática de glicose apresentou-se elevada nos animais que foram submetidos à ingestão de dieta rica em frutose em relação ao grupo controle (p<0,05), e o tratamento com alopurinol evitou a hiperglicemia estimulada pela frutose. Com relação ao metabolismo lipídico, a concentração plasmática de colesterol total mostrou uma redução de 43,9 % e 31,4% no grupo da frutose em relação ao grupo controle (P<0,001) e ao grupo F+A (P<0,05), respectivamente. Aumento nos níveis de triglicerídeos e HDL colesterol foram observados no grupo F+A. O tratamento com alopurinol aumentou 128,6% e 59,7% os níveis de HDL em relação ao grupo C (<0,001) e grupo F (P<0,001), respectivamente e paradoxalmente, aumentou os níveis de triglicerídeos em relação ao grupo controle (P<0,001). (tabela 2)

Na avaliação da função hepática, não houve diferença significativa em relação aos níveis plasmáticos das transaminases hepáticas e albumina entre os grupos estudados. Conforme pode ser observado na tabela 2, os níveis séricos do ácido úrico nos ratos submetidos ao tratamento com alopurinol foram menores que no grupo frutose, demonstrando a eficácia do alopurinol em diminuir a produção hepática de ácido úrico.

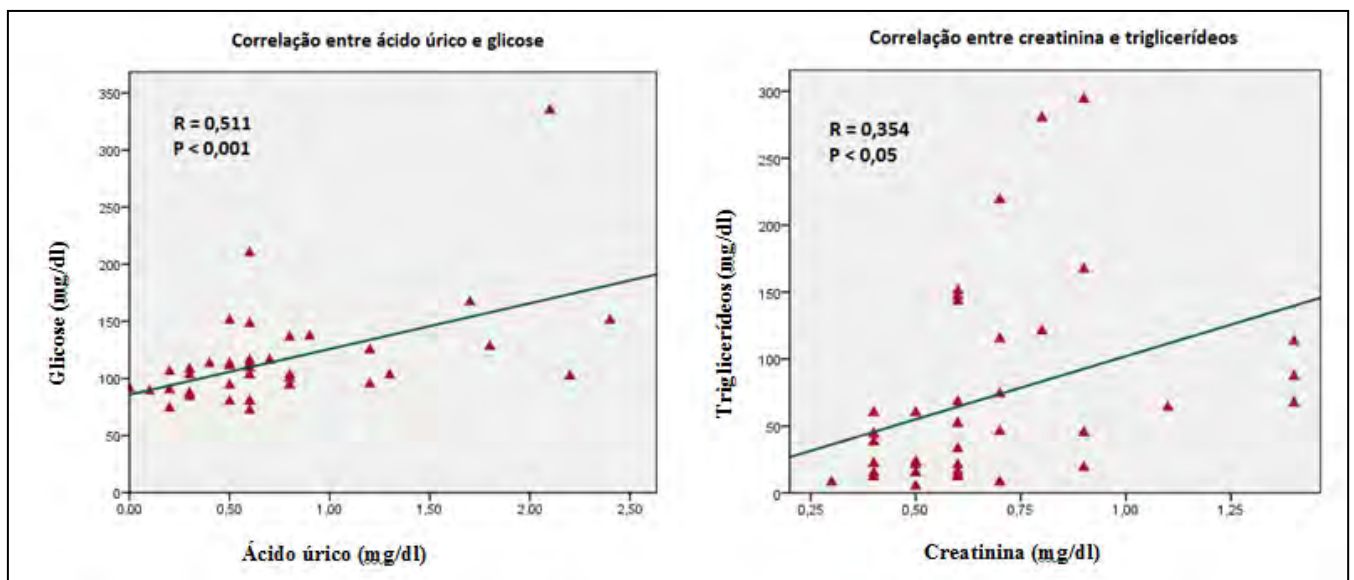
Constatou-se correlação positiva e estatisticamente significativa entre os níveis de ácido úrico versus glicose e creatinina versus triglicerídeos entre os grupos. (figura 1)

**Tabela 2** Parâmetros bioquímicos e hematológicos dos grupos

	C	F	F + A
Glicose (mg/dl)	97 ± 3,07	145,8 ± 16,86*	106,6 ± 12,49
Ácido úrico (mg/dl)	0,67 ± 0,13	1,11 ± 0,18	0,44 ± 0,06 #
Ácido úrico urinário	0,59 ± 0,07	0,64 ± 0,09	0,53 ± 0,15
Colesterol total (mg/dl)	50,53 ± 2,45	28,31 ± 3,54***	41,3 ± 3,43#
Triglicerídeos	25,27 ± 5,55	77 ± 18,31	134 ± 27,87**
HDL (mg/dl)	12,2 ± 3,42	17,47 ± 5,79	27,9 ± 8,02 ***
AST (mg/dl)	113 ± 12,38	238,4 ± 75,31	186,9 ± 58,35
ASL (mg/dl)	38,93 ± 2,32	123,9 ± 65,08	114,7 ± 68,83
Albumina (mg/dl)	3,15 ± 0,11	2,86 ± 0,11	2,96 ± 0,07

C (Grupo Controle), F (Grupo Frutose), F + A (Grupo Alopurinol). Os valores representam a média ± erro padrão. \*P<0,05 vs C; \*\*P<0,01 vs C; \*\*\*P<0,001 vs C; # P<0,05 vs F.

**Figura 1** Correlação entre as variáveis:



### Análise histológica do fígado

Na avaliação histológica, observou-se que o consumo de frutose ao longo das 14 semanas desenvolveu nos ratos um grau de esteatose predominantemente macrovesicular com intensidade leve e discreto grau de fibrose. O processo de inflamação foi totalmente localizado em espaço lobular, poupando a região portal e com grau de balonização de leve a moderada intensidade. Com relação à atividade necroinflamatória, houve diferença altamente significativa entre o grupo F e controle ( $P < 0,001$ ), mostrando que o alopurinol reduziu em 72% o desenvolvimento da atividade necroinflamatória nos ratos tratados. A medicação também foi eficaz na prevenção da formação da esteatose macrovesicular e fibrose, visto na diferença estatística apenas entre o grupo F e controle ( $P < 0,01$ ), com diminuição de 27% e 26%, respectivamente. No que se refere a inflamação lobular e esteatose microvesicular, não houve diferença entre os grupos (tabela 3).

**Tabela 3** Análise histológica do fígado dos grupos

	C	F	F + A
Atividade necroinflamatória	0	1,07 ± 0,26***	0,3 ± 0,15
Esteatose macrovesicular	0,06 ± 0,06	0,69 ± 0,17**	0,5 ± 0,16
Esteatose microvesicular	0,06 ± 0,06	0,3 ± 0,15	0,3 ± 0,13
Balonização	0	1,07 ± 0,17***	0,7 ± 0,15**
Inflamação lobular	0,06 ± 0,06	0,76 ± 0,12	0,6 ± 0,16
Fibrose	0,06 ± 0,06	0,54 ± 0,14*	0,4 ± 0,16

C (Grupo Controle), F (Grupo Frutose), F + A (Grupo Alopurinol). Os valores representam a média ± erro padrão. \*\*\* $P < 0,001$  vs C; \*\*  $P < 0,01$  vs C; \*  $P < 0,05$  vs C;

### DISCUSSÃO

No presente estudo, os ratos tratados com alopurinol na dose de 30mg/kg/dia por 14 semanas obtiveram redução significativa dos níveis de ácido úrico e não apresentaram hiperglicemia induzida pela frutose, diferindo dos resultados de outros estudos que utilizaram doses menores (inferior à 10mg/kg/dia) por período de tempo mais curto (< 8 semanas) não ocorrendo redução da glicemia e sim apenas da resistência à insulina (22). Reungjui et al. (41)

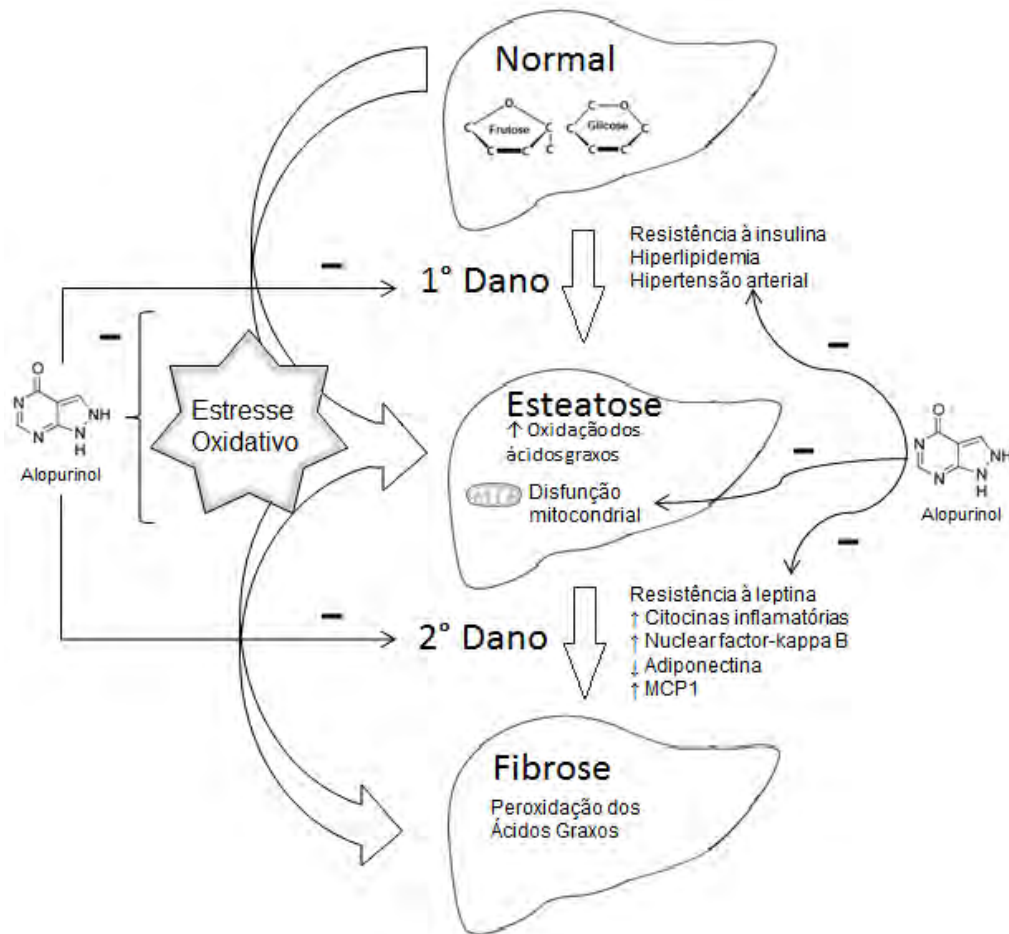
com objetivo de avaliar a ação do diurético tiazídico na promoção da síndrome metabólica, inibiram a ação hiperglicêmica do diurético com alopurinol na dose de 150mg/L e reposição de potássio apenas após 20 semanas de exposição à dieta rica em frutose. Por outro lado, Perez-Pozo et al. (28) ao efetuarem estudo clínico randomizado com o uso do alopurinol para tratamento da síndrome metabólica em 74 homens adultos após administração de 200 g de frutose por dia por 2 semanas constataram diminuição da pressão arterial e LDL-colesterol, entretanto não observaram melhora na resistência à insulina e nos níveis de triglicerídeos. Até o presente momento, poucas teorias tentam explicar o aumento da resistência à insulina promovida pela hiperuricemia. Nakagawa et al, (20) sugerem que a hiperuricemia leva à resistência à insulina por disfunção endotelial por inibição na produção e biodisponibilidade endotelial de óxido nítrico.

Com relação ao perfil lipídico, o grupo de ratos tratados com alopurinol apresentaram aumento dos valores de HDL colesterol e triglicerídeos, diferindo de todos os demais estudos que utilizaram ratos Sprague-Dawley propensos à obesidade, dislipidemia e hiperglicemia, e que com o uso do alopurinol apresentaram redução dos valores de triglicerídeos sem alteração significativa do HDL colesterol. Nakagawa et al. (20) sugeriram que a hiperuricemia promoveria hipertrigliceridemia por diminuir a depuração renal dos triglicerídeos decorrente da redução na atividade da ação da lipase lipoproteica em células endoteliais. Shelmadine et al. (42) avaliando marcadores da síndrome metabólica em pacientes renais crônicos submetidos ao uso de alopurinol (300mg/dia) observaram esse efeito paradoxal do aumento dos triglicerídeos com diminuição dos níveis de ácido úrico promovido pelo alopurinol.

Armutcu et al (43) ao estudarem ratos Wistar machos alimentados com frutose a 10% dissolvidas em água por 10 dias, observaram esteatose hepática macrovesicular e microvesicular sem qualquer inflamação e fibrose. Kawasaki et al., (44) concluíram em estudo realizado com ratos Wistar, que a dieta (ração) rica em frutose (70%) consumida por 5 semanas comparada à dieta rica em gorduras, corresponde ao melhor modelo de EHNA, com distribuição de inflamação lobular predominante sobre a portal, semelhante em humanos. Os pesquisadores comprovam que o incremento da frutose na ração, em comparação com a sua diluição em água, é mais efetivo em promover esteatose e inflamação hepática. Entretanto, no presente estudo, demonstrou-se que a suplementação dietética com água rica em frutose (20%) por um período de tempo prolongado (14 semanas) promoveu esteatose macrovesicular moderada com inflamação totalmente lobular e fibrose leve no fígado, diferindo de resultados de estudos anteriores que também utilizaram apenas água rica em frutose.

O tratamento com alopurinol foi efetivo em evitar a necroinflamação e fibrose hepática induzida pela frutose, sendo dessa forma o primeiro estudo que comprovaria a ação de um inibidor da xantina oxidase na prevenção da EHNA. Jeon et al. (45) e Rhodion et al. (46) em pesquisa realizada com ratos, submetidos à isquemia hepática temporária com posterior reperfusão e à administração profilática de alopurinol, observaram-se um efeito protetor na necrose hepatocelular, prevenindo o estresse oxidativo e a peroxidação de lipídios, fatores essenciais na patogênese da EHNA. Kono et al., (48), em experimento realizado com ratos da linhagem Wistar, induziram hepatite alcoólica com administração de 10-16 g/kg/dia de álcool e dieta rica em gordura por 4 semanas, concluindo que o uso do alopurinol em dose alta (100mg/kg/dia) preveniu injúria hepática com diminuição em 50% nos níveis das transaminases e infiltração neutrofílica no fígado e 60% no acúmulo de gordura, inflamação e necrose hepática. Recentemente, Aldaba-Muruato et al. (49) induziram fibrose hepática em ratos com tetracloreto de carbono (potente indutor de estresse oxidativo) e a administração de alopurinol (100mg/kg/dia) preveniu dano hepático agudo e cirrose hepática pela sua potente ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-fibrótica.

Pesquisadores com base em estudos experimentais comprovam o aumento da ação da XO na EHNA (50) e a sua ação indutora de estresse oxidativo, promovendo lesão mitocondrial (51) que corresponde, segundo o modelo de Day e James (52) ao primeiro insulto na fisiopatologia da EHNA, na qual ocorre o desenvolvimento de esteatose decorrente de uma alteração aguda da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e aumentando a predisposição do fígado a um segundo insulto, este mediado por citocinas (FNT- $\alpha$  e  $\beta$ , interleucina 8, entre outros) e radicais livres de oxigênio que promoveriam a hepatite e fibrose hepática. Com relação às citocinas, estudiosos comprovam a ação inflamatória da XO. Baldiw et al. (53), em estudo realizados com ratos Pound (modelo de ratos com resistência a leptina e insulina), comprovaram que a hiperuricemia promove aumento da proteína quimiotática de monócitos 1 (potente pró-inflamatório) e redução da adiponectina (principal adipocina anti-inflamatória). Wang et al. (54) avaliando ratos diabéticos (lesão pancreática por streptozotocina) constataram o efeito anti-inflamatório sinérgico do alopurinol (100mg/kg/dia) associado a n-acetilcisteína (1,5g/kg/dia) em reduzir o TNF- $\alpha$  e interleucina 1 e aumentar a adiponectina no coração. Dessa forma podemos supor que o alopurinol inibindo a XO atuará em várias vias metabólicas e inflamatórias que são comuns tanto para a síndrome metabólica como a EHNA (figura 2) e pelo seu potente efeito antioxidante demonstrado por pesquisadores em estudos anteriores, atuará simultaneamente em todos os estágios da DHGNA, comprovado no presente estudo pela diminuição em 72% da atividade necroinflamatória e 26% da fibrose hepática.



**Figura 2:** Vias metabólicas e inflamatórias inibidas pelo alopurinol

Resumindo, o presente estudo demonstrou a eficácia do alopurinol na prevenção da EHNA e no controle glicêmico em um modelo experimental de DHGNA induzida pela ingestão de dieta rica em frutose.

## REFERÊNCIAS

1. Ludwig, L., Viggiano, T. R., McGill, D. B., Oh, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55(7):434-8.
2. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Internal Medicine, Ann Intern Med.* 1997; 126(2):137-45.
3. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(1):171-80.
4. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1221-31.
5. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and Risk Factors for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Dionysos Nutrition and Liver Study. *Hepatology,* 2005; 42:44-52.
6. Medina J, Fernández-Salazar LI, García-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care.* 2004; 27:2057-66.
7. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001; 50:1844-50.
8. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004; 114(2):147-52.
9. Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:143-50
10. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999; 107(5):450-5.

11. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(5):911-22.
12. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab.* 2005; 2(1):5.
13. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:537-43.
14. Havel, P. J. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* 2005, 63:133-57.
15. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86:899-906.
16. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295:R1370-5, 2008.
17. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 1987; 10:512-6.
18. Dai, S., McNeil, J. H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1995; 33(2):101-7.
19. Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ, Gontijo JA. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Braz J Med Biol Res.* 2001; 34(9):1155-60.

20. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, et al. A causal role for uric in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290:F625-31.
21. Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. *European Journal of Pharmacology, Eur J Pharmacol*. 1999; 373:R1-4.
22. Roncal CA, Reungjui S, Sánchez-Lozada LG, Mu W, Sautin YY, Nakagawa T, Johnson RJ. Combination of captopril and allopurinol retards fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Nephrol*. 2009; 30:399-404
23. Yoo TW, Sung KC, Shin HS, Kim BJ, Kim BS, Kang JH, Lee MH, Park JR, Kim H, Rhee EJ, et al. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. *Circ J*. 2005; 69:928-33.
24. Lee J, Sparrow D, Vokonas PS, Landsberg L, Weiss ST. Uric acid and coronary heart disease risk: evidence for a role of uric acid in the obesity-insulin resistance syndrome. The Normative Aging Study. *Am J Epidemiol*. 1995; 142:288-94.
25. Freedman DS, Williamson DF, Gunter EW, Byers T. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. *Am J Epidemiol*. 1995; 141:637-44.
26. Bandaru, P.; Shankar, A. Association between Serum Uric Acid Levels and Diabetes Mellitus. *Int J Endocrinol*. 2011;2011:604715. Epub 2011 Nov 2.
27. Perlstein TS, Gumieniak O, Williams GH, Sparrow D, Vokonas PS, Gaziano M, Weiss ST, Litonjua AA. Uric acid and the development of hypertension the normative aging study. *Hypertension*. 2006; 48:1031-6.
28. Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response *Int J Obes*. 2010; 34:454-61.

29. Lee YJ, Lee HR, Lee JH, Shin YH, Shim JY. Association between serum acid and non-alcoholic fatty disease in Korean adults. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med.* 2010; 48:175-80.
30. Yamada T, Suzuki S, Fukatsu M, Wada T, Yoshida T, Joh T. Elevated serum uric acid is an independent risk factor for nonalcoholic fatty liver disease in Japanese undergoing a health checkup. *Acta Gastroenterol Belg.* 2010; 73:12-7.
31. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 May; 26:202-8.
32. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010; 362:1675-85.
33. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, Patumraj S, Klaikeaw N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Med Assoc Thai.* 2007; 90:788-97.
34. Abdelmalek MF, Sanderson SO, Angulo P, Soldevila-Pico C, Liu C, Peter J, Keach J, Cave M, Chen T, McClain CJ, et al. Betaine for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Results of a Randomized Placebo-Controlled Trial. *Hepatology.* 2009; 50(6):1818-26.
35. Zein CO, Yerian LM, Gogate P, Lopez R, Kirwan JP, Feldstein AE, McCullough AJ. Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology.* 2011; 54:1610-9.
36. Ratziu V, de Ledinghen V, Oberti F, Mathurin P, Wartelle-Bladou C, Renou C, Sogni P, Maynard M, Larrey D, Serfaty L, et al. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2011; 54:1011-9.
37. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(1):87-114.

38. Sharabi Y, Oron-Herman M, Kamari Y, Avni I, Peleg E, Shabtay Z, Grossman E, Shamiss A. Effect of PPAR-gamma agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am J Hypertens.* 2007; 20:206-10.
39. Suzuki Y, Sudo J, Tanabe T. Allopurinol toxicity: its toxic organ-specificity between the liver and the kidney in the rat. *J Toxicol Sci.* 1984; 9:343-51.
40. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:2467-74.
41. Reungjui S, Roncal CA, Mu W, Srinivas TR, Sirivongs D, Johnson RJ, Nakagawa T. Thiazide diuretics exacerbate fructose-induced metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:2724-31.
42. Shelmadine B, Bowden RG, Wilson RL, Beavers D, Hartman J. The effects of lowering uric acid levels using allopurinol on markers of metabolic syndrome in end-stage renal disease patients: a pilot study. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2009; 9:385-9.
43. Armutcu F, Coskun O, Gurel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem.* 2005;38:540-7.
44. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr.* 2009;139:2067-71.
45. Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300:E581-91, 2011.

46. Jeon BR, Yeom DH, Lee SM. Protective effect of allopurinol on hepatic energy metabolism in ischemic and reperfused rat liver. *Shock*. 2001; 15:112-7.
47. Rhoden E, Pereira-Lima L, Lucas M, Mauri M, Rhoden C, Pereira-Lima JC, Zettler C, Petteffi L, Belló-Klein A. The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Eur Surg Res*. 2000; 32:215-22.
48. Kono H, Rusyn I, Bradfor B, Connor H, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.293, p.296-302, 2000
49. Aldaba-Muruato LR, Moreno MG, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. Protective effects of allopurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: Modulation of NF- $\kappa$ B, cytokine production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(2):65-75, 2011
50. Baskol G, Baskol M, Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem*. 2007; 40:776-80.
51. Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 300:581-91.
52. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. *Gastroenterology*. 1998; 114:842-5 .
53. Baldwin W, McRae S, Marek G, Wymer D, Pannu V, Baylis C, Johnson RJ, Sautin YY. Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011; 60(4):1258-69, 2011.

54. Wang T, Qiao S, Lei S, Liu Y, Ng KF, Xu A, Lam KS, Irwin MG, Xia Z. N-acetylcysteine and allopurinol synergistically enhance cardiac adiponectin content and reduce myocardial reperfusion injury in diabetic rats. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23967.

## OUTROS RESULTADOS ENCONTRADOS

**Tabela 1** Relação entre consumo de água e ração e diurese dos grupos

	C	F	F + A
Ração (g/dia)	22,20 ± 0,91	13,76 ± 0,46*	12,93 ± 0,73*
Água (ml/dia)	32,63 ± 1,09	29,08 ± 1,05	33,20 ± 2,72
Diurese (ml/dia)	0,057 ± 0,004	0,034 ± 0,003	0,137 ± 0,009*#

C (Grupo Controle), F (Grupo Frutose), F + A (Grupo Alopurinol). Os valores representam a média ± erro padrão. \*P<0,001 vs C; #P<0,001 vs F.

**Tabela 2** Outros parâmetros bioquímicos avaliados dos grupos

	C	F	F + A
Creatinina (mg/dl)	0,61 ± 0,06	0,53 ± 0,02	0,96 ± 0,08##*
Ureia (mg/dl)	42,13 ± 1,9	19,08 ± 1,68**	53,2 ± 5,77#*
Microalbuminúria	0,18 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,26 ± 0,13

C (Grupo Controle), F (Grupo Frutose), F + A (Grupo Alopurinol). Os valores representam a média ± erro padrão. \*P<0,01 vs C; \*\*P<0,001 vs C; # P<0,01 vs F.

**Figura 1:** Mortalidade entre os grupos