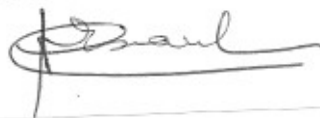


GUSTAVO HENRIQUE DA SILVA

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a) Gustavo Henrique da Silva.
Campinas, 30 de janeiro de 2009.

Prof(a). Dr(a). Cecília Amelia Fazzio Escanhoela
Orientadora.



CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES
MITOCONDRIAIS NA ESTEATOSE HEPÁTICA DE CAUSA NÃO
DETERMINADA EM GRUPO PEDIÁTRICO

GUSTAVO HENRIQUE DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES
MITOCONDRIAIS NA ESTEATOSE HEPÁTICA DE CAUSA NÃO
DETERMINADA EM GRUPO PEDIÁTRICO

Tese apresentada por Gustavo Henrique da Silva ao
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da
Faculdade de Ciências Médicas como pré-requisito
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CECILIA AMELIA FAZZIO ESCANHOELA

CAMPINAS – SP
UNICAMP
2009

*FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP*

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si38c

Silva, Gustavo Henrique da
Caracterização morfológica das alterações mitocondriais na
esteatose hepática de causa não determinada em grupo pediátrico /
Gustavo Henrique da Silva. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Fígado. 2. Esteatose hepática. I. Escanhoela, Cecilia Amelia
Fazzio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Morphological characterization of mitochondrial alterations in
hepatic steatosis of cause not defined in childhood group**

Keywords: • Liver
• Fatty liver

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador : Profa. Dra. Cecília Amelia Fazzio Escanoela

Membros:

1. Profa. Dra. Valéria Pereira Lanzoni

Valéria P. Lanzoni

2. Prof. Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas

Luiz Antonio Rodrigues de Freitas

3. Profa. Dra. Adriana Maria Alves de Tommaso

Adriana Maria Alves de Tommaso

4. Prof. Dr. Jose Vassallo

Jose Vassallo

5. Profa. Dra. Cecília Amelia Fazzio Escanoela

Cecília Amelia Fazzio Escanoela

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/01/2009

Dedico este trabalho...

Ao meu Pai, presente ao meu lado em todos os momentos dessa longa caminhada, não permitindo que me desviasse de meus objetivos finais. Mais que um pai, um grande companheiro e amigo que é tão merecedor desta conquista quanto eu.

À minha Mãe (in memoriam), maior incentivadora da busca ao conhecimento, que com seu jeito simples mostrou o quão valioso é o estudo e que não mediu esforços para fazer com que eu chegasse até aqui. Certamente iluminou meus caminhos para que eu não tropeçasse.

À minha amada, minha vida, Anamélia, que me acalma nos momentos necessários, traz alegria quando fico triste e me faz querer sempre ser um homem melhor. Quando entrou em minha vida trouxe consigo o verdadeiro significado da felicidade.

Agradecimento a Deus...

Obrigado, Senhor, por ter iluminado meu caminho e permitido que eu pudesse completar mais esta etapa tão importante da minha vida. Agradeço por tudo que recebi e aprendi nestes anos e peço que me dê a graça de utilizar todos estes conhecimentos em benefício do próximo.

Agradecimento especial...

À Dr^a Cecília, por ter me aceitado como seu aluno e por ter confiado em mim, e também pela orientação e dedicação dispensada, transmitindo seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida com muito boa vontade, paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dra. Valéria Pereira Lanzoni, Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas, Dra. Adriana Maria Alves de Tommaso, Dr. José Vassallo e Dr. Norair Salviano dos Reis pela honra de tê-los como membros da banca. Suas sugestões e críticas enriqueceram muito este trabalho.

À Dra. Kunie Iabiku Coelho pela grande ajuda em ceder casos para composição de nosso grupo controle e estudo.

Ao Dr. Gabriel Hessel pelos ensinamentos e também pela contribuição com a casuística.

À Dona Geralda, Lucinha e Adilson, não somente “funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica”, mas sim amigos, sempre prestativos, que certamente foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Maria do Carmo e Beth, sempre alegres e pacientes, que “tomaram conta” de mim com relação aos prazos, disciplinas, normas...

À Prof^a Miralva e ao Prof. Gonzaga pela amizade, compreensão e apoio para o desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Pedro Paulo pelo contínuo incentivo e entusiasmo em prol da realização do Doutorado.

Aos pacientes, que permitiram a realização deste trabalho e que inconscientemente participaram do progresso da ciência em benefício da humanidade.

E a todos, não citados nominalmente aqui, que direta ou indiretamente, contribuíram para execução deste trabalho.

RESUMO

A esteatose hepática não relacionada ao alcoolismo pode ocorrer isoladamente ou fazer parte da doença hepática gordurosa não alcoólica (DGHNA). Esta abrange um amplo espectro de alterações morfológicas, variando desde a esteatose até um estágio mais grave, acompanhado por fibrose, podendo chegar à cirrose. O objetivo do nosso estudo foi avaliar e caracterizar a esteatose de causa não definida na infância, por meio de análise morfológica e morfométrica do tecido hepático. Dezoito biópsias provenientes de 16 pacientes com idade variando de 3 meses a 12 anos e 9 meses, com vaga dor abdominal e/ou mínima hepatomegalia associada a aumento discreto e persistente das enzimas hepáticas, foram analisadas através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Nestes detectou-se esteatose macro e microvesicular “pura”, ou seja, não acompanhada de fibrose ou de quaisquer outras alterações histológicas. Na microscopia de luz foi realizada a determinação semi-quantitativa da intensidade da esteatose total (macro e microvesicular), com classificação de 1 a 4 e a estimativa da porcentagem de hepatócitos afetados pela esteatose microvesicular em relação aos hepatócitos afetados pela macrovesicular; na microscopia eletrônica calculou-se a densidade mitocondrial por hepatócito e a área mitocondrial média utilizado-se em ambos os casos o programa TPS Dig versão 1.30. Dez pacientes com 1 a 14 anos de idade e com diagnóstico de normalidade em biópsia hepática foram utilizados como grupo controle. Os resultados obtidos mostraram predomínio de esteatose microvesicular entre os pacientes estudados (61%), com elevação significativa da área mitocondrial, sendo $1,52 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ a área média para o grupo controle, $1,49 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$ para o grupo de esteatose macrovesicular e $2,92 \pm 0,36 \mu\text{m}^2$ para o grupo de esteatose microvesicular. Não foram observadas alterações significativas na densidade mitocondrial, seja relacionada à esteatose microvesicular predominante ou à macrovesicular (72 ± 2 mitocôndrias/hepatócitos).

para o grupo controle, 70 ± 11 mitocôndrias/hepatócitos para o grupo de esteatose macrovesicular e 66 ± 8 mitocôndrias/hepatócitos para o grupo de esteatose microvesicular). Tampouco se observou correlação entre as variações dos valores das transaminases com ambos os tipos de esteatose, uma vez que para o grupo de esteatose microvesicular os valores médios foram $AST = 62.9 \pm 35.0$, $ALT = 125.9 \pm 129.0$ e $GGT = 210.5 \pm 278.3$ e para o grupo de esteatose macrovesicular $AST = 82.1 \pm 97.5$, $ALT = 57.4 \pm 41.4$ e $GGT = 185.8 \pm 141.7$.

No grupo de estudo, a esteatose “pura”, com pouca ou nenhuma sintomatologia clínica, associada ou não a alterações de transaminases, não relacionada à obesidade ou doença metabólica conhecida, mostrou-se predominantemente microvesicular e relacionada a aumento do volume mitocondrial. Nas hepatopatias mitocondriais primárias (HMP), principalmente por defeitos na cadeia respiratória, este tipo de alteração é comum. Devido a estas alterações mitocondriais, esta esteatose não deve ser denominada “pura” podendo, inclusive, corresponder à porção mais distal no longo espectro da DGHNA. Destacamos que, apesar da pouca manifestação clínica e laboratorial destas crianças, é fundamental o acompanhamento sistemático destas, havendo necessidade de maior atenção aos casos de esteatose na infância com predomínio da forma microvesicular.

ABSTRACT

Hepatic steatosis unrelated to alcoholism may occur separately or be part of fatty liver disease (NAFLD). It encompasses a wide spectrum of morphologic alterations, ranging from steatosis to a more severe stage accompanied by fibrosis and cirrhosis. The aim of our study was to assess and characterize childhood steatosis of not defined cause carrying out morphologic and morphometric analysis of liver tissue. Eighteen biopsies from 16 patients with age varying from 3 months to 10 years, with vague abdominal pain and/or minimal hepatomegaly associated with slight and persistent increase in hepatic enzymes had been analyzed through light microscopy and transmission electron microscopy. On those patients, “pure” steatosis was detected, meaning it was not followed of fibrose or any other significant histological alterations.

In light microscopy total steatosis was semi-quantified with estimative of macro- and microvesicular steatosis percentage and determination of predominant steatosis, classified from 1 to 4 and estimate the percentage of hepatocytes affected by steatosis microvesicular in comparison to hepatocytes affected by macrovesicular; in electron microscopy it was determined the degree of mitochondrial density in the hepatocytes and mean mitochondrial surface area using in both cases the TPS Dig version 1.30. Ten patients between 1 and 14 years old who had a normal diagnosis on liver biopsy were used as a control group.

The results had shown microvesicular predominance of steatosis in the studied patients (61%) with significant increase of mitochondrial surface area values: $1,52 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ in the control group, $1,49 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$ in the macrovesicular steatosis group and $2,92 \pm 0,36 \mu\text{m}^2$ in the microvesicular steatosis group. Significant alterations in mitochondrial density were not observed, neither related to predominant micro nor macrovesicular steatosis (72 ± 2 mitochondrias/hepatocytes in the control group, 70 ± 11 mitochondrias/hepatocytes in the

macrovesicular steatosis group and 66 ± 8 mitochondrias/hepatocytes in the microvesicular steatosis group). A correlation between variations in transaminases levels and both types of steatosis was also not observed, since for the microvesicular steatosis group the average values was $AST = 62.9 \pm 35.0$, $ALT = 125.9 \pm 129.0$ and $GGT = 210.5 \pm 278.3$ and for the macrovesicular steatosis $AST = 82.1 \pm 97.5$, $ALT = 57.4 \pm 41.4$ e $GGT = 185.8 \pm 141.7$.

In our study group, “pure” steatosis, with little or no clinical symptoms, associate or not to alterations of transaminases and that did not correlate with obesity or known metabolic diseases is predominantly microvesicular and was related to increased mitochondrial volume. In the primary mitochondrial hepatopathies (PMH), especially for respiratory chain defects, this alteration is common. Due to these probable mitochondrial alterations, this steatosis doesn’t have to be called “pure”, being able, also, to correspond to the portion distal in the long specter of the NAFLD. It is important to emphasize that although the small number of clinical and laboratorial manifestations of these children, it is essential their systematic accompaniment. There is necessity of more attention to the cases with steatosis in pediatric group where microvesicular form predominance occurs.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

ILUSTRAÇÃO	PÁGINA
Quadro 01 - Prevalência da DGHNA em diferentes populações.	30
Quadro 02 - Diagnósticos diferenciais da esteatose na DGHNA.	32
Figura 01- A – Esteatose macrovesicular e B – Esteatose microvesicular.	36
Figura 02 - Resumo do metabolismo gerador de energia nas mitocôndrias.	42
Figura 03 - Representação esquemática da cadeia respiratória.	46
Figura 04 - (A) A enzima é composta de uma porção “cabeça”, a F_1 ATPase, e um carreador trans-membrânico de H^+ , chamado de F_0 .	48
Figura 05 - Mecanismos envolvidos na lesão celular induzida por lípidos na DGHNA.	52
Tabela 01 - Resultado das análises morfométricas em microscopia de luz com relação ao grau de esteatose total e percentual de esteatose microvesicular em relação à macrovesicular.	76
Figura 06 - Micrografias das biópsias hepáticas em microscopia de luz.	77
Figura 07 - Micrografias das colorações especiais.	78
Figura 08 - Micrografias eletrônicas das biópsias hepáticas evidenciando a dimensão mitocondrial.	80
Figura 09 - Representação gráfica da análise morfométrica de área mitocondrial média dos pacientes do grupo controle, grupo com esteatose macrovesicular e com esteatose microvesicular.	81
Tabela 02: Valores da área mitocondrial média para cada amostra e respectivo desvio padrão dentro dos grupos Esteatose Macrovesicular predominante, Esteatose Microvesicular predominante e Controle.	82
Figura 10 - Micrografias eletrônicas dos hepatócitos evidenciando a densidade de mitocôndrias	83
Figura 11 - Representação gráfica da análise morfométrica de densidade mitocondrial dos pacientes do grupo controle, grupo com esteatose macrovesicular e com esteatose microvesicular.	83

ILUSTRAÇÃO	PÁGINA
Tabela 03 - Descrição dos parâmetros avaliados nos 18 pacientes do grupo de estudo.	85
Tabela 04 - Valores médios dos parâmetros bioquímicos para cada grupo de estudo.	86
Figura 12 - Ultrassonografia realizada nos anos de 2000, 2001 e 2004.	88
Figura 13 -Micrografias de microscopia de luz e eletrônica de transmissão nas diferentes biópsias.	89
Figura 14 - Área mitocondrial média obtida para as três biópsias realizadas.	90
Tabela 05 - Valores das enzimas hepáticas, parâmetros bioquímicos e resultados da morfometria.	90
Tabela 06 - Protocolo de processamento histológico dos fragmentos hepáticos para microscopia de luz.	129
Tabela 07 - Protocolo de preparação de lâminas histológicas.	129
Quadro 03 - Protocolo de coloração das lâminas histológicas.	130
Tabela 08 - Protocolo de processamento histológico dos fragmentos hepáticos para microscopia eletrônica de transmissão.	131
Figura 15: Índice de Massa Corpórea para indivíduos do sexo masculino.	132
Figura 16: Índice de Massa Corpórea para indivíduos do sexo feminino.	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLA	SIGNIFICADO
µm	Micrômetro
ADCC	Acil-CoA desidrogenase de "cadeia-curta"
ADCL	Acil-CoA desidrogenase de "cadeia-longa"
ADCM	Acil-CoA desidrogenase de "cadeia-média"
ADCML	Acil-CoA desidrogenase de "cadeia-muito-longa"
AGL	Ácidos Graxos Livres
ALT	Alanino aminotransferase
ApoB	Apo-lipoproteína B
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
ChREBP	<i>Carbohydrate responsive element-binding protein</i>
cm	Centímetros
CoA	Coenzima A
Colest	Colesterol total
DGHNA	Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica
DNAmt	Ácido Desoxirribonucléico mitocondrial
EHNA	Esteato-hepatite não-alcoólica
ERO	Espécime Reativa de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FOx	Fosforilação Oxidativa
g	Gramas
GGT	Gama-glutamilttransferase
h	Hora
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	Hematoxila-Eosina
HMP	Hepatopatias mitocondriais primárias
IMC	Índice de Massa Corpórea

SIGLA	SIGNIFICADO
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min	Minuto
ML	Microscopia de Luz
NAD	Nicotinamida Dinucleotídeo
nm	Nanômetro
NRF	<i>Nuclear respiratory factor</i>
PA	Puro para análise
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PGC	<i>Proliferator-activated γ-receptor Coactivator</i>
PMTP	Poros mitocondrial de transição de permeabilidade
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTM	Proteína Trifuncional Mitocondrial
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SDDmt	Síndrome da Depleção de DNA mitocondrial
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
TM	Tricrômico de Masson
TNF α	<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
Triglic	Triglicerídeos
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. DOENÇA GORGUOSA HEPÁTICA NÃO-ALCOÓLICA (DGHNA)	29
2.1.1. Observações clínicas	30
2.1.1.1. Avaliação laboratorial	31
2.1.1.2. Diagnóstico por imagens	31
2.1.1.3. Características histológicas da DGHNA	33
2.1.1.3.1. Esteatose	34
2.1.1.3.2. Esteato-hepatite	36
2.1.1.3.3. Fibrose e cirrose	37
2.1.2. Patogênese da DGHNA	37
2.1.3. Classificação e estágio da DGHNA	39
2.1. MORFOFISIOLOGIA DA MITOCÔNDRIA	40
2.2.1. β -oxidação mitocondrial	44
2.2.2. Transporte mitocondrial do elétron e o sistema de fosforilação oxidativa (FOx)	46
2.2.3. Defeitos na cadeia respiratória mitocondrial	49
2.2.3.1. Espécies reativas de oxigênio	55
2.2.3.2. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α , Tumoral Necrosis Factor- α)	55
2.2.3.3. Coativador do γ -receptor do Proliferador ativo-1 (PGC-1, Proliferador-activated γ -receptor Coativador-1)	56
2.3. MECANISMOS DA ESTEATOSE HEPÁTICA	57
3. OBJETIVOS	61

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	65
4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES E CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	67
4.2. GRUPO CONTROLE	68
4.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL A SER OBSERVADO EM MICROSCOPIA DE LUZ (ML) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	68
4.4. ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ	69
4.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MITOCÔNDRIAS	70
4.6. LEVANTAMENTO DE DADOS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DOS PACIENTES	72
5. RESULTADOS	73
5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ	75
5.2. PADRONIZAÇÃO DE ÁREA E DENSIDADE MITOCONDRIAL HEPÁTICA EM GRUPO INFANTIL	79
5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	79
5.4. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	84
5.5. ANÁLISE DO PERFIL DA ESTEATOSE HEPÁTICA E DAS ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM PACIENTE SUBMETIDO A TRÊS BIÓPSIAS SEQUENCIAIS	86
6. DISCUSSÃO	91
7. CONCLUSÕES	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXO I	127

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento desta tese de Doutorado foi estimulado pela própria dificuldade na interpretação do diagnóstico histopatológico de esteatose hepática em crianças, relativamente frequente na rotina clínico-ambulatorial. Diante da necessidade de melhor caracterizar tal alteração neste grupo específico de pacientes, realizamos um levantamento na casuística dos Departamentos de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), visando a realização de estudo retrospectivo, por meio de análise morfológica e morfométrica, em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Na microscopia eletrônica, o presente estudo direcionou-se à mitocôndria, organela que, como será visto na próxima seção, está intimamente relacionada à esteatose. A partir da década de 80, alterações morfológicas hepáticas relacionadas à esteatose predominante, porém com etiologias diversas, excetuando-se o álcool, passaram a ser denominadas “Doença Gordurosa Hepática Não-Alcoólica” (DGHNA). Conceitualmente, trata-se de doença hepática manifestada por esteatose que, a partir de algum momento, evoluiria desfavoravelmente, com inflamação, balonização e fibrose perissinusoidal e/ou portal (sendo então chamada de esteato-hepatite), podendo culminar com o desenvolvimento de cirrose. Somos da opinião que caso a esteatose “pura” seja mista, ou ainda, predominantemente microvesicular, deva compor o espectro mais distal desta doença, visto que nesta casuística, em que a esteatose foi a única alteração morfológica presente, predominaram os casos com predomínio da forma microvesicular, traduzindo algum dano mitocondrial, a despeito da ausência de balonização, inflamação e/ou fibrose. O termo esteatose “pura” deveria ficar, portanto, restrito aos casos de esteatose predominantemente macrogoticular não acompanhada por balonização, inflamação e/ou fibrose. No entanto, o objetivo principal com

a realização deste trabalho não foi o de questionar a atual definição da DGHNA, e sim o de caracterizar amplamente a esteatose em grupo pediátrico.

Ao organizar a Revisão da Literatura, optou-se pela inserção de elementos do conhecimento que estivessem diretamente ligados à fundamentação teórica da Tese de Doutorado. Uma vez que investigamos primordialmente a relação das alterações mitocondriais com a esteatose hepática na infância, incluímos aspectos relacionados à DGHNA e à esteatose hepática “pura”, bem como estudos sobre a morfo-fisiologia da mitocôndria, seus principais processos metabólicos e defeitos na sua função. Iniciamos com a descrição da DGHNA e não diretamente pela esteatose, uma vez que, inevitavelmente, a segunda é uma alteração presente na primeira.

Na sequência, detalhamos os objetivos gerais e específicos, bem como a composição da casuística, com os critérios de inclusão e exclusão e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho. Os resultados foram expressos de maneira clara e organizada, permitindo facilmente sua análise e colaborando para a compreensão da discussão destes na seção seguinte. Por fim, são descritas as conclusões obtidas frente aos objetivos propostos e discutimos os resultados obtidos, comparando-os aos já existentes e apoiados pela literatura científica pertinente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DOENÇA GORDUROSA HEPÁTICA NÃO-ALCOÓLICA (DGHNA)

A doença hepática gordurosa não-alcoólica, termo clínico-patológico, abrange um amplo espectro de doenças, que vai desde o simples acúmulo de lípidos em hepatócitos até cirrose, passando por estágios de esteato-hepatite (esteatose hepática com inflamação e fibrose). (Neuschwander-Tetri & Caldwell, 2003; Browning & Horton, 2004). A prevalência da DGHNA na população geral é estimada entre 3 – 24% (Zhou et al., 2007) e superior a 80% em indivíduos obesos e diabéticos (Wieckowska et al, 2007). O quadro 01 resume a prevalência de DGHNA em alguns países. Este termo foi utilizado quase que exclusivamente para a doença no adulto, entretanto, com o aumento de sua prevalência em todos os segmentos da população, sua utilização se tornou mais abrangente (Browning & Horton, 2004), tendo sido descrita em todas as faixas etárias, incluindo crianças (Zafrani, 2004; Nobili et al., 2006). Em crianças, a DGHNA é caracterizada pela ausência de identificação de alterações inatas no metabolismo dos lípidos (Marion et al., 2004), tendo sido primeiramente reportada na década de 80 (Moran et al., 1983). Desde então, muitos outros casos têm sido descritos, tendo como características principais: ocorrência em crianças principalmente do sexo masculino, maiores elevações dos valores de ALT do que de AST, hipertrigliceridemia (como típica anormalidade lipídica sanguínea) e vaga dor abdominal, como razão inicial para avaliação clínica (Rachid & Roberts, 2000; Molleston et al., 2002; Marion et al., 2004).

População	Intervalo de prevalência	Estudos publicados
Mundial	3% - 24%	Browning et al., 2004 Clark, 2006 Neuschwander-Tetri e Caldwell, 2003
Itália	20 – 25%	Bedogni et al., 2006
Israel	30%	Amarapurkar et al., 2007
Coréia	16%	Park et al., 2006
Alemanha	14%	Bellentani et al., 1994
Japão	14%	Nomura et al., 1988
China	11,7% -15%	Zhou et al., 2007 Marchesini et al., 2005

Quadro 01 - Prevalência da DGHNA em diferentes populações.

No Japão, Tominaga et al. (1995) relataram, num estudo com 810 crianças, que 2.6% apresentaram DGHNA diagnosticada por ultrassonografia, com forte relação com obesidade e elevação da massa corpórea. Apesar da alta ocorrência da DGHNA na obesidade e diabetes, muitos outros diagnósticos podem se relacionar a esta (Quadro 02).

2.1.1. Observações clínicas

A maioria dos pacientes com DGHNA são assintomáticos, mas alguns podem apresentar queixa de fadiga e incômodo ou dor abdominal no quadrante direito superior. Mais de 50% dos pacientes apresentam hepatomegalia (Sanyal, 2002). Pacientes com cirrose instalada

devida à DGHNA apresentam achados clínicos similares aos pacientes com cirrose relacionada a outras causas (Bayard et al., 2006).

2.1.1.1. Avaliação laboratorial

As alterações laboratoriais são, frequentemente, o sinal mais significativo da DGHNA. A alteração mais comum é a elevação da alanina aminoaminotransferase (ALT) e da aspartato aminoaminotransferase (AST), geralmente com níveis uma a quatro vezes além do limite da normalidade (Sanyal, 2002). Entretanto, pacientes com DGHNA podem ter níveis normais das aminoaminotransferases. A relação de AST/ALT é geralmente maior que 1 (na DGHNA, esta relação tipicamente pode ser maior que 2), podendo haver aumento de acordo com a gravidade dos danos hepáticos (Sorbi et al., 1999). A fosfatase alcalina pode ter elevação de duas vezes além do limite da normalidade (Sanyal, 2002) e a gama-glutamilttransferase também pode estar elevada (Bayard et al., 2006).

2.1.1.2. Diagnóstico por imagens

Os exames de imagem auxiliam no diagnóstico da DGHNA, por meio da identificação de gordura infiltrada no fígado. A ultrassonografia hepática tem sensibilidade de 82 a 89% e especificidade de 93% para a identificação de gordura infiltrada no fígado (Joseph et al., 1991; Hultcrantz & Gabrielsson, 1993). A tomografia computadorizada é mais sensível do que a ultrassonografia, porém apresenta custo maior (Bayard et al., 2006). No entanto, as várias modalidades de exames por imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética e

ultrassonografia) não são capazes de distinguir entre esteatose e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (Saadeh et al., 2002).

Fatores Gerais/Nutricionais	Doença sistêmica aguda
	Inanição aguda
	Desnutrição protéica
	Nutrição parenteral total
	Doença intestinal inflamatória
	Doença celíaca
	Síndrome de Mauriac
	Hepatite pelo vírus C
	Fibrose cística
	Doença de Wilson
Infecções	Deficiência de α -antitripsina
	Galactosemia
	Intolerância Hereditária a Frutose
	Doença de Wolman
	Glicogenose
	Defeitos mitocondriais ou peroxissomais na oxidação de ácidos graxos
	Lipodistrofias
	Abetalipoproteinemia
	Doença de Weber-Christian
	Síndrome de Schwachman
Disfunções Metabólicas	Amiodarona
	Methotrexato
	Prednisolona
	L-asparaginase, methorexato
	Vitamina A
	Valproato
	Tamoxifeno
	Zidovudina e tratamentos anti-HIV
	Ecstasy

Quadro 02 - Diagnósticos diferenciais da esteatose na DGHNA.

2.1.1.3. Características histológicas da DGHNA

O espectro das lesões patológicas observadas na DGHNA são pouco distinguíveis daquelas induzidas pelo álcool na doença hepática. Diferenças entre as duas condições são baseadas essencialmente em argumentos clínicos e bioquímicos, além da avaliação do usuário de álcool: os pacientes com hepatite alcoólica são, geralmente, mais doentes, apresentam níveis mais elevados de bilirrubina no soro, além de apresentarem cirrose com maior frequência (Sanyal, 2002). Histologicamente, na DGHNA, a atividade necroinflamatória e a fibrose são provavelmente, mais suaves, os corpúsculos de Mallory mais raros e os depósitos de glicogênio nuclear mais frequentes (Sanyal, 2002).

O papel da biópsia hepática na DGHNA é controverso. Embora a biópsia do fígado seja geralmente segura, dor transitória pode ocorrer em 30% dos pacientes, dor importante em 3% e complicações significativas em menos de 3%. O risco de morte é de 0.03% (Dienstag, 2002), mas a biópsia é o único método de confiança para diagnosticar EHNA e determinar o prognóstico (Sanyal, 2002). Pacientes com doença hepática avançada apresentam indicação para realização de biópsia. Os fatores de risco para a doença mais avançada incluem diabetes, obesidade mórbida ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$), idade avançada e relação AST/ALT maior que 1 (Angulo et al., 1999). A Associação Americana de Gastroenterologia indica que a decisão e o momento para a realização de biópsia hepática em paciente com suspeita de DGHNA deve ser particularizada e deve incluir a participação do paciente no processo de tomada de decisão (Sanyal, 2002).

2.1.1.3.1. Esteatose

Esteatose é definida como o acúmulo anormal de triglicérides dentro de células parenquimatosas, observada com grande frequência (mas não exclusivamente) no fígado, principalmente devido ao seu envolvimento no metabolismo lipídico (Cotran et al., 2000). Dentre as principais causas da esteatose temos: ação de toxinas, desnutrição, *diabetes mellitus*, obesidade e abuso de álcool (Day & James, 1998b; Cotran et al., 2000).

Segundo Sherlock & Dooley (2002) o acúmulo de lípidos no fígado pode ocorrer por meio de quatro mecanismos:

- a. Aumento da liberação de gordura ou ácidos graxos da dieta para o fígado: lípidos da dieta são transportados na circulação principalmente como quilomícrons, e ácidos graxos são incorporados como triglicérides nos adipócitos. Tanto quilomícrons como triglicérides remanescentes podem se acumular no fígado.
- b. Aumento da síntese mitocondrial de lípidos ou redução da oxidação, aumentando a produção de triglicérides.
- c. Estagnação da exportação de triglicérides para fora das células hepáticas: a exportação de triglicérides dos hepatócitos depende da ligação a apoproteínas, fosfolípidos e VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), sendo que estas ligações podem ser inibidas.
- d. Excesso de carboidratos liberados para o fígado podem ser convertidos a ácidos graxos.

A distribuição de lípidos nas células hepáticas pode ser macrovesicular (Fig. 1A), havendo distensão do hepatócito por um único e volumoso vacúolo, com alteração da localização nuclear, ou microvesicular (Fig. 1B) com numerosos (e menos volumosos) vacúolos, mantendo-se a localização central do núcleo (Day & James, 1998b). A esteatose microvesicular ocorre

como resultado da alteração na β -oxidação mitocondrial, que conduz ao acúmulo de ácidos graxos na forma de triglicérides e formação de pequenas gotículas no citosol dos hepatócitos (Natarajan et al., 2006; Fromenty & Pessayre, 1995). A oxidação de ácidos graxos no fígado pode ocorrer nas mitocôndrias e nos peroxissomos, sendo que na β -oxidação peroxissomal é gerada elevada quantidade de peróxido de hidrogênio não acoplado ao sistema fosforilativo (Natarajan et al., 2006).

A esteatose microvesicular geralmente é condição aguda, ocorrendo uma pausa na β -oxidação dos ácidos graxos (Fromenty & Pessayre, 1995), geralmente por perturbação da função mitocondrial e ribossomal, dentro e fora do fígado (Day & James, 1998b). Este tipo de esteatose apresenta maior importância clínica, sendo que o fígado não é o único órgão envolvido, podendo ocorrer acúmulo de triglicérides nos túbulos renais e, ocasionalmente, no miocárdio, cérebro e pâncreas (Sherlock & Dooley, 2002). Experimentalmente foi verificado, em porcos, que a capacidade regenerativa dos hepatócitos na esteatose macrovesicular é mais efetiva do que na esteatose microvesicular, implicando prognóstico menos favorável para esta última (Oleszczuk et al., 2007).

Insuficiência hepática não é, usualmente, causa de morte, entretanto, coma pode ser relatado por aumento dos níveis séricos de amônia ou por edema cerebral (Sherlock & Dooley, 2002). Em contraste, a esteatose macrovesicular é tipicamente associada a distúrbio de longa duração do metabolismo hepático de lípidos. Apesar de ser considerada condição benigna por Sherlock (1995), pode se associar ao desenvolvimento de necroinflamação (esteato-hepatite), fibrose e cirrose, relacionada ou não ao abuso de álcool (Bacon et al., 1994).

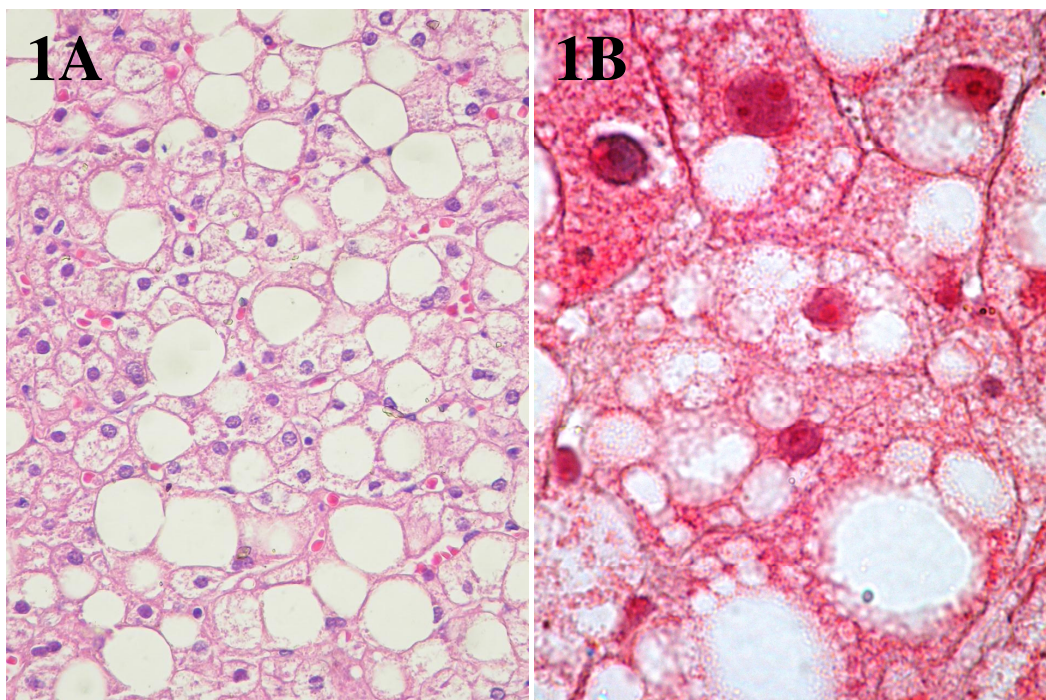


Figura 01: **A** – Esteatose macrovesicular: notar os grandes vacúolos dentro de cada célula tornando o núcleo excêntrico. **B** – Esteatose microvesicular: notar que apesar dos inúmeros vacúolos dentro de cada célula, o núcleo se apresenta em sua posição central. HE, 400x e Tricrômico de Masson 800x, respectivamente.

A esteatose, de graus variados, pode ser difusa dentro do lóbulo hepático ou predominar na zona 3 acinar, ao redor das veias hepáticas terminais (Zafrani, 2004). Depósitos de glicogênio nuclear são observados em menos de um terço dos pacientes (Reid, 2001).

2.1.1.3.2. Esteato-hepatite

A esteato-hepatite é definida pela associação da esteatose com outras lesões hepatocelulares, essencialmente balonização e necroinflamação. Os hepatócitos balonizados são amplos, com citoplasma claro, e os corpos apoptóticos podem ser notados (Zafrani, 2004). Corpúsculos de Mallory, que consistem de agregados intracitoplasmáticos de filamentos intermediários de citoqueratina, não são observados constantemente, e sua presença não é necessária para o diagnóstico da esteato-hepatite; podem se apresentar pequenos, escassos e

inconspícuos (Reid, 2001). Inclusões eosinofílicas, que correspondem na microscopia eletrônica a megamitocôndrias com perda das cristas e contendo inclusões para-cristalinas (Cadwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001), são ocasionalmente observadas no citoplasma dos hepatócitos. A intensidade da infiltração inflamatória varia com a gravidade da esteatohepatite. A inflamação é geralmente mista, contendo linfócitos e neutrófilos em torno dos hepatócitos alterados e/ou nas áreas portais (Zafrani, 2004).

2.1.1.3.3. Fibrose e cirrose

A presença e a extensão da fibrose são dados extremamente importantes para a determinação do prognóstico. A fibrose perissinusoidal é, inicialmente, suave e predominante na zona 3, em torno das veias hepáticas terminais. Pode haver associação com fibrose portal e periportal, com formação progressiva de pontes fibrosas entre as veias hepáticas terminais e áreas portais, ou entre os intervalos portais adjacentes. A cirrose ocorre quando os nódulos hepatocelulares formados são cercados completamente pela fibrose anular. Insuficiência hepática, hipertensão e carcinoma hepatocelular podem então complicar a doença (Bugianesi et al., 2002; Ratziu et al, 2002; Hui et al., 2003).

2.1.2. Patogênese da DGHNA

Atualmente, a teoria mais aceita para se explicar a patogênese da DGHNA é a hipótese dos “dois golpes”, postulada por Day e James (1998a). De acordo com esta hipótese, a esteatose representa o “primeiro golpe,” que aumenta a vulnerabilidade do fígado para vários

“segundos golpes” que levam, por sua vez, à inflamação, fibrose e morte celular, características da EHNA.

Corroborando com esta hipótese, a administração de vários “segundos golpes” (por exemplo, por endotoxina e pró-oxidante) resultam em dano hepático e mortalidade significativamente maior em ratos obesos com o fígado gorduroso, comparado aos ratos magros com os fígados saudáveis (Yang et al., 2001; Ito et al., 2006). Além disso, nos seres humanos, a gravidade da esteatose é um dos indicativos mais fortes do desenvolvimento de EHNA. Diversos fatores foram sugeridos para constituir os segundos golpes, especialmente estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias e endotoxina bacteriana (Clark & Diehl, 2002; Harrison et al., 2002; Festi et al., 2004; Lieber, 2004). É importante destacar, entretanto, que estes mecanismos não são mutuamente exclusivos, mas preferivelmente atuam de maneira coordenada e cooperativa para acelerar o desenvolvimento e a progressão de EHNA. Por exemplo, a adiposidade central está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e ao estresse oxidativo, assim como uma resposta inflamatória exagerada está associada à administração de endotoxina (Yang et al., 1997). Uma vez geradas, as citocinas podem causar dano direto ao fígado ou atuar indiretamente aumentando o estresse oxidativo, que por sua vez pode igualmente danificar diretamente a função hepática ou atuar indiretamente perpetuando a resposta inflamatória (Abdelmalek & Diehl, 2006). Consequentemente, nos ambientes propícios à geração de vários segundos golpes (por exemplo, obesidade), um ciclo de perpetuação de agressões pode causar injúria hepática e culminar em EHNA e, progressivamente, em doença hepática grave.

Um aspecto importante da teoria de “dois golpes” é que a esteatose por si só não é causa do desenvolvimento de EHNA, mas um sensibilizante do fígado aos efeitos prejudiciais dos segundos golpes, tal que um fator de estresse inócuo a um fígado saudável, pode levar ao desenvolvimento de EHNA em um fígado esteatótico (Gentile & Pagliassotti, 2008).

2.1.3. Classificação e estágio da DGHNA

O prognóstico da DGHNA depende da intensidade dos achados histopatológicos, tanto da atividade necroinflamatória (esteatose e necroinflamação) como do estadiamento, que reflete o padrão e a extensão da fibrose, assim como a remodelação da arquitetura (Brunt et al., 1999). Para tanto, algumas classificações têm sido propostas para se graduar estes dois elementos, separada ou conjuntamente. Na classificação proposta por Matteoni et al. (1999), teríamos quatro tipos de lesões: o tipo 1 corresponde à esteatose simples, tipo 2 à esteatose com inflamação lobular, tipo 3 com presença adicional de hepatócitos balonizados e o tipo 4 existência dos corpúsculos de Mallory ou de fibrose. Um método muito utilizado para a classificação da EHNA foi o proposto por Brunt e colaboradores (1999), que não correlaciona a atividade necroinflamatória ao estadiamento. Este método baseia-se na intensidade das alterações celulares e inflamatórias (esteatose, balonização, inflamação lobular e portal), definindo-se três classes de atividade necroinflamatória: leve, moderada e grave. O estadiamento se classifica em quatro níveis: estágio 1- fibrose perissinusoidal focal ou extensa na zona 3; estágio 2- fibrose periportal focal ou extensa adicional; estágio 3- fibrose perissinusoidal e portal com focal ou extensa formação de pontes (septos); estágio 4- cirrose. A Sociedade Brasileira de Patologia, em 2006 (Freitas & Cotrim, 2006), propôs uma classificação em que vários itens relacionados à atividade necroinflamatória (esteatose macro e microvesicular, balonização, inflamação lobular e portal e pseudo-inclusão nuclear de glicogênio) são avaliados e graduados, sem contudo se chegar a um índice final de atividade. A avaliação do estadiamento passa pela graduação da fibrose perissinusoidal e portal, com definição de quatro estágios: estágio 0- ausência de fibrose na zona 3; estágio 1- arquitetura lobular preservada, com fibrose perissinusoidal limitada às áreas perivenulares; estágio 2- arquitetura lobular preservada, com fibrose perissinusoidal e formação

de finos septos esparsos, com ou sem expansão fibrosa portal; estágio 3- arquitetura lobular alterada, com septos unindo estruturas vasculares entre si; esboço de nódulos; estágio 4- arquitetura predominantemente nodular ou cirrose instalada.

2.1. MORFOFISIOLOGIA DA MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é a usina energética celular, que gera o ATP ou o calor a partir de substratos derivados da gordura e da glicose. Os hepatócitos são, normalmente, ricos em mitocôndrias, sendo que cada célula contém, aproximadamente, 800 mitocôndrias, que ocupam ao redor de 18% do volume celular do fígado. O número de mitocôndrias diminui com a idade porém, inversamente, esta aumenta de tamanho, mantendo-se o volume mitocondrial total em relação ao volume da célula. O volume das mitocôndrias varia levemente em relação ao seu posicionamento no ácino hepático: mitocôndrias da zona 1 medem entre 0,4 a 0,6 μm por 0,7 a 1,0 μm e na zona 3, 0,5 a 0,6 μm por 0,6 a 0,8 μm , exibindo formato arredondado ou elíptico (Phillips et al., 1987).

A mitocôndria é formada por uma dupla membrana, contendo matriz e genoma. A membrana externa é sustentada pela membrana interna, regulando o efluxo de enzimas, cátions e substratos para o citosol, além de ser o sítio de transporte específico para vários substratos que devam passar do citosol para dentro da mitocôndria (Treem & Sokol, 1998; Sokol & Treem, 1999). A membrana interna contém cadeias “eletrônicas” de transporte, que aceitam elétrons gerados no ciclo do ácido cítrico e na oxidação de ácidos graxos. Nesta, existem numerosos transportadores específicos para várias moléculas e enzimas (ATP-sintases) que medeiam a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP. A matriz mitocondrial contém enzimas do ciclo do

ácido tricarboxílico, da β -oxidação de ácidos graxos, da síntese de uréia e de outras vias metabólicas (Treem & Sokol, 1998; Sokol & Treem, 1999).

As mitocôndrias se utilizam tanto do piruvato como de ácidos graxos para combustível. O piruvato deriva da glicose e de outros açúcares, e os ácidos graxos derivam das gorduras. As duas formas de combustível são transportadas através da membrana interna e são convertidas em um intermediário metabólico fundamental, a acetil Coenzima A (acetil-CoA), por enzimas localizadas na matriz mitocondrial (Figura 02) (Brand et al., 2004).

Na membrana mitocondrial interna há uma proteína estrutural (que envolve o translocador da adenina nucleotídeo) chamada de *poro mitocondrial de transição de permeabilidade* (PMTP); este é mantido normalmente fechado, mas pode ser aberto por diversas substâncias endógenas ou exógenas (Lemasters et al., 1998). As enzimas envolvidas na importação e na β -oxidação de ácidos graxos, ou no ciclo do ácido tricarboxílico, são codificados pelo DNA nuclear (Fromenty & Pessayre, 1995). Os polipeptídeos e as enzimas envolvidas na importação e na β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa estão na membrana interna, enquanto que aqueles envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos de cadeias média e curta, ou no ciclo do ácido tricarboxílico, estão na matriz, junto ao DNA mitocondrial (DNAMt) (Pessayre et al., 1999).

O DNAMt codifica 13 polipeptídeos da cadeia respiratória, enquanto que as proteínas restantes (aproximadamente 80) são codificadas pelo DNA nuclear. As mitocôndrias produzem a maior parte da energia da célula pela oxidação de vários combustíveis e pelo sistema de fosforilação oxidativa (Fromenty & Pessayre, 1995). A β -oxidação de derivados graxos da acil-coenzima A (acil-CoA) e a oxidação da acetil-CoA pelo ciclo do ácido tricarboxílico são

associados com a conversão de NAD^+ e de FAD para NADH e FADH_2 (Pessayre et al., 1999). Estes co-fatores reduzidos são então re-oxidados pelos canais respiratórios em NAD^+ e FAD .

Os quatro pares de hidrogênio (e seus elétrons) liberados no ciclo de Krebs são imediatamente transportados para a cadeia respiratória, que é um processo gerador de ATPs; o O_2 serve deceptor final dos hidrogênios (e elétrons), gerando uma molécula de H_2O para cada par de elétrons transportados pelo NADH e FADH_2 , gerados não só do ciclo de Krebs, mas de qualquer outra reação metabólica celular.

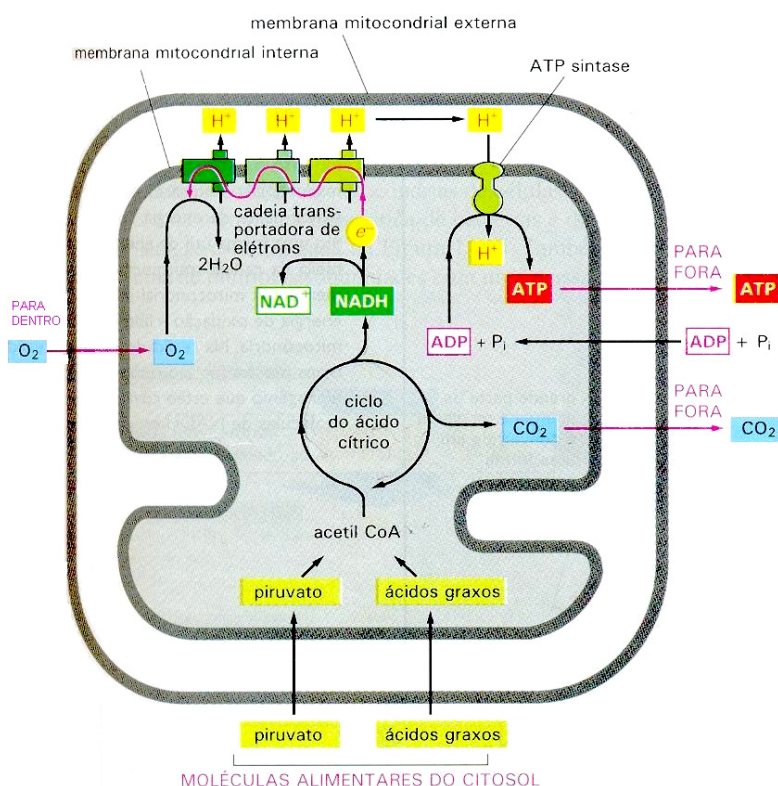


Figura 02 - Resumo do metabolismo gerador de energia nas mitocôndrias. O piruvato e os ácidos graxos entram na mitocôndria (base) e são convertidos em acetil-CoA, que é metabolizada pelo ciclo do ácido cítrico, que reduz NAD^+ em NADH (e FAD e FADH_2 , não representado). No processo de fosforilação oxidativa, os elétrons de alta energia do NADH (e do FADH_2) são transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons da membrana interna (cadeia respiratória) para o oxigênio (O_2). Este transporte de elétrons gera um gradiente de prótons através da membrana, que é utilizado para direcionar a produção de ATP pela ATP sintase. O NADH gerado pela glicólise no citosol também transfere elétrons para a cadeia respiratória (não-representada). Uma vez que o NADH não pode passar através da membrana mitocondrial interna, a transferência de elétrons do NADH citosólico deve estar acoplada indiretamente por meio de um dos vários sistemas carreadores que transportam outro componente reduzido para dentro da mitocôndria; depois de ser oxidado, este composto é devolvido ao citosol, onde é reduzido novamente pelo NADH (Brand et al., 2004).

Alguns elétrons do NADH e do FADH₂ são transferidos diretamente por intermédio dos canais respiratórios ao oxigênio, formando o ânion superóxido e outra espécie reativa de oxigênio (ERO) (Fromenty & Pessayre, 1995). As mitocôndrias são as principais fontes endógenas de ERO na célula normal (Shigenaga et al., 1994; Fromenty & Pessayre, 1995). A maioria dos elétrons, entretanto, migra ao longo da cadeia respiratória até a citocromo c-oxidase, onde ocorre a combinação de prótons e oxigênio, formando água. Esta transferência dos elétrons através dos canais respiratórios está associada à extrusão de prótons da matriz no espaço intermembranoso, gerando considerável potencial eletroquímico através da membrana interna, cuja energia potencial é usada na ATP sintase. Quando a energia é necessária, os prótons novamente entram na matriz através da porção Fo da ATP sintase e causam a movimentação do rotor molecular na F1 ATP sintase e a fosforilação do ADP em ATP (Saraste, 1999; Pessayre et al., 2000).

O DNAm_t é uma molécula circular, em dupla hélice, presente em inúmeras cópias por célula, uma vez que há inúmeras cópias deste em cada mitocôndria (Fromenty & Pessayre, 1995; Schon et al., 1997). O DNAm_t é extremamente sensível, tanto aos danos oxidativos devido à sua proximidade com a membrana interna (principal fonte celular de ERO), como à ausência de histonas protetoras e a mecanismos incompletos de reparo nas mitocôndrias (Fromenty & Pessayre, 1995; Bogenhagen, 1999; Pessayre et al., 1999).

Defeitos em enzimas específicas da matriz, embora raros, podem ocasionar defeitos na oxidação de ácidos graxos, síntese de uréia, gliconeogênese e outros. Tais defeitos são causados, quase em sua totalidade, por mutações no DNA nuclear (Sokol & Treem, 1999; Treem & Sokol, 1998).

As funções essenciais da mitocôndria estão relacionadas à diversidade dos sistemas enzimáticos presentes nos vários compartimentos desta organela, sendo a sua maior função a

síntese de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa para impulsionar as reações energia-dependentes e os processos de transporte de todas as células dos tecidos (Treem & Sokol, 1998). A transdução de energia pela transferência de elétrons dos substratos do ciclo do ácido tricarboxílico (via NADH) e do ciclo de oxidação de ácidos graxos (via NADH e FADH₂) para o oxigênio é facilitada pela cadeia respiratória, composta de cinco complexos protéicos: **NADH-desidrogenase** (Complexo I), **Succinato-ubiquinona** (complexo II), **Citocromos bc₁ ou Ubiquinona-citocromo c oxidorreductase** (Complexo III), **Citocromo oxidase** (Complexo IV) e a **ATP sintase** (complexo V) (Mandel et al., 2001; Treem & Sokol, 1998; Bioulac-Sage et al., 1993; Wallace, 1989). Estes complexos estão representados na Figura 03.

As mitocôndrias parecem exercer ainda um papel central na indução de necrose celular e apoptose, por meio da geração de estresse oxidativo, abrindo poros permeáveis transitórios, com liberação de citocromo c e fator indutor de apoptose, além de ativação intracelular de caspases e proteinases. Estes processos celulares não são apenas importantes durante a injúria celular, mas também apresentam papel fundamental no desenvolvimento, remodelagem tecidual e carcinogênese (Sokol & Treem, 1999).

2.2.1. β -oxidação mitocondrial

A β -oxidação mitocondrial é o processo metabólico por meio do qual os ácidos graxos naturais são quebrados progressivamente para subunidades de acetil-coenzima A (acetil-CoA), podendo então se condensar em corpos de cetona (principalmente acetoacetato e β -hidroxibutirato) ou se incorporar ao ciclo do ácido tricarboxílico e serem oxidados a CO₂ e H₂O (Fromenty & Pessayre, 1995).

Ao fim do processo de β -oxidação mitocondrial, os ácidos graxos devem primeiramente cruzar as membranas mitocondriais e serem convertidos a seus correspondentes tioésteres da acil-CoA dentro das mitocôndrias. Os ácidos graxos de cadeia curta (3 a 5 carbonos) e de cadeia média (6 a 13 carbonos) podem prontamente cruzar as membranas externa e interna da mitocôndria, e serem ativados em tioésteres de acil-CoA na matriz mitocondrial, por meio das acil-CoA-sintetase de cadeias curta e média; esta ativação requer CoA e ATP (Bremer, 1983; Schulz, 1991).

Ácidos graxos de cadeia longa (de 14 a 18 carbonos), ao contrário, não podem cruzar livremente a membrana mitocondrial interna e, conseqüentemente, necessitam de um sistema específico de carreamento, extremamente complexo (Fromenty & Pessayre, 1995). Este, resumidamente, apresenta 4 etapas fundamentais: (1) uma oxidação, realizada pela enzima Acil-CoA desidrogenase, com liberação de uma molécula de FADH₂, (2) uma hidratação, efetivada com participação da enzima Enoil-CoA hidratase, (3) nova oxidação, realizada pela enzima Hidroxiacil-CoA desidrogenase, com liberação de NADH e por fim, (4) uma tiólise, realizada pela β -tiolase (Brand et al., 2004). Neste processo haverá produção de moléculas de Acetil-CoA (uma para cada carbono da molécula do ácido graxo utilizado no processo) utilizadas sequencialmente no ciclo do ácido tricarboxílico.

A finalidade do processo de β -oxidação (e no subseqüente ciclo do ácido tricarboxílico) é gerar equivalentes reduzidos. Os equivalentes reduzidos gerados pela oxidação da gordura podem então ser oxidados a H₂O pela cadeia respiratória mitocondrial. A energia produzida assim é aproveitada na produção de ATP pelo sistema de fosforilação oxidativa (FOx), com transferência dos elétrons ao longo da cadeia respiratória (Fromenty & Pessayre, 1995).

2.2.2. Transporte mitocondrial do elétron e o sistema de fosforilação oxidativa (FOx)

A FOx é uma via metabólica que gera energia (ATP) na mitocôndria. O sistema da FOx é composto de cinco complexos de enzimas (numeradas de I a V) localizadas na membrana interna mitocondrial. Cada complexo respiratório possui diversas subunidades (4 a 40). Algumas destas subunidades são codificadas pelo DNA nuclear, sintetizadas no citoplasma e transportadas para a mitocôndria, enquanto outras (13 subunidades) são codificadas diretamente pelo DNA mitocondrial (DNAm) (Fromenty & Pessayre, 1995).

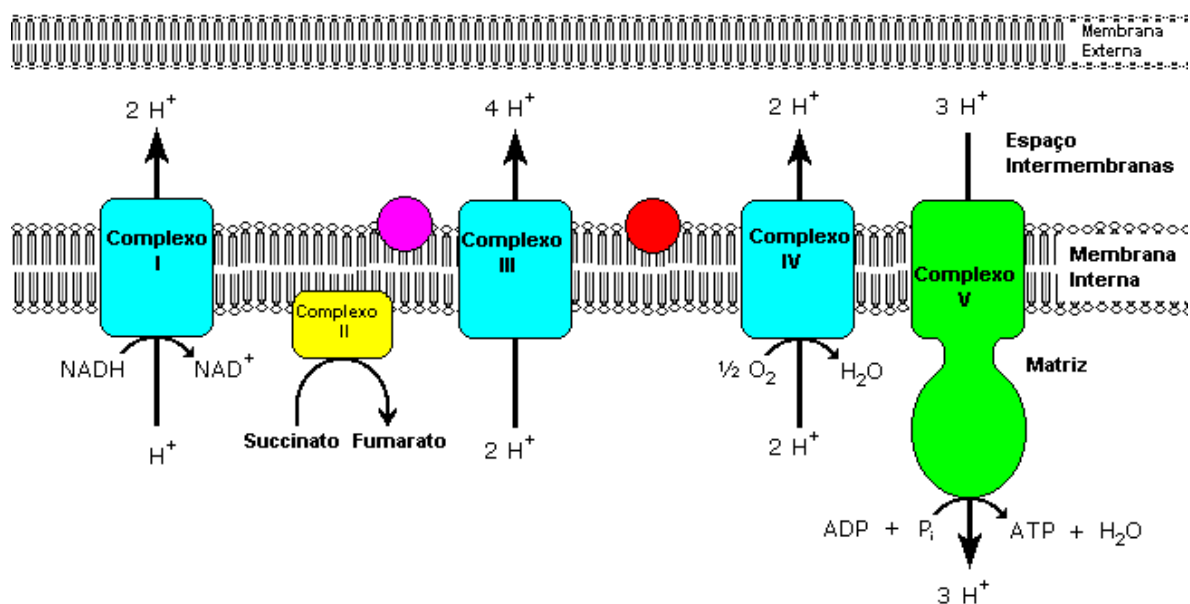


Figura 03 - Representação esquemática da cadeia respiratória. Conforme os elétrons de alta energia (não representados) passam através da cadeia respiratória, parte da energia liberada é utilizada para direcionar os complexos enzimáticos que bombeiam H^+ para fora do espaço da matriz. O gradiente eletroquímico de prótons resultante através da membrana interna direciona H^+ de volta através da ATP sintase (Complexo V). O fluxo de H^+ é utilizado para a síntese de ATP a partir de ADP e P_i da matriz (adaptado de Brand et al., 2004).

Os complexos I ao IV constituem a cadeia de transporte do elétron e o complexo V é uma ATP sintase (Figura 03). Os elétrons entram inicialmente em diferentes locais na cadeia respiratória (Fromenty & Pessayre, 1995):

1. O NADH produzido por várias enzimas, incluindo a L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase do ciclo da β oxidação, sede elétrons ao complexo I.
2. A flavina-adenina dinucleotídeo, reduzido produzido pela succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo do ácido tricarboxílico, fornece elétrons para o complexo II.
3. A redução do ETF (que deriva seus elétrons do ADCL, ADCM, ADCC OU ADCML) alimenta com elétrons o complexo III. Os elétrons cedidos ao complexo I ou ao complexo II são transferidos então ao complexo III, que os fornece ao complexo IV. Este, por sua vez, transfere elétrons ao oxigênio molecular, que são combinados com prótons para gerar H_2O .

A transferência dos elétrons através dos complexos I, III e IV (em cada um destes três sítios acoplados) resulta na translocação de prótons da matriz no compartimento intermembranoso, criando um importante gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. Normalmente, a energia potencial deste gradiente é utilizada secundariamente para gerar a energia na produção de ATP. Certamente, quando os prótons retornam à matriz através da fração F_o da ATP sintase (complexo V), a energia liberada por esta re-entrada é aproveitada na síntese do ATP (ADP e fosfato inorgânico) pela porção F_1 do complexo V (Figura 04) (Hatefi, 1985). Uma analogia a este sistema seria o bombeamento de água nível acima por um motor térmico (a cadeia respiratória) em um reservatório atrás de uma represa, com aproveitamento da energia para as turbinas hidrelétricas (ATP sintase) (Fromenty & Pessayre, 1995).

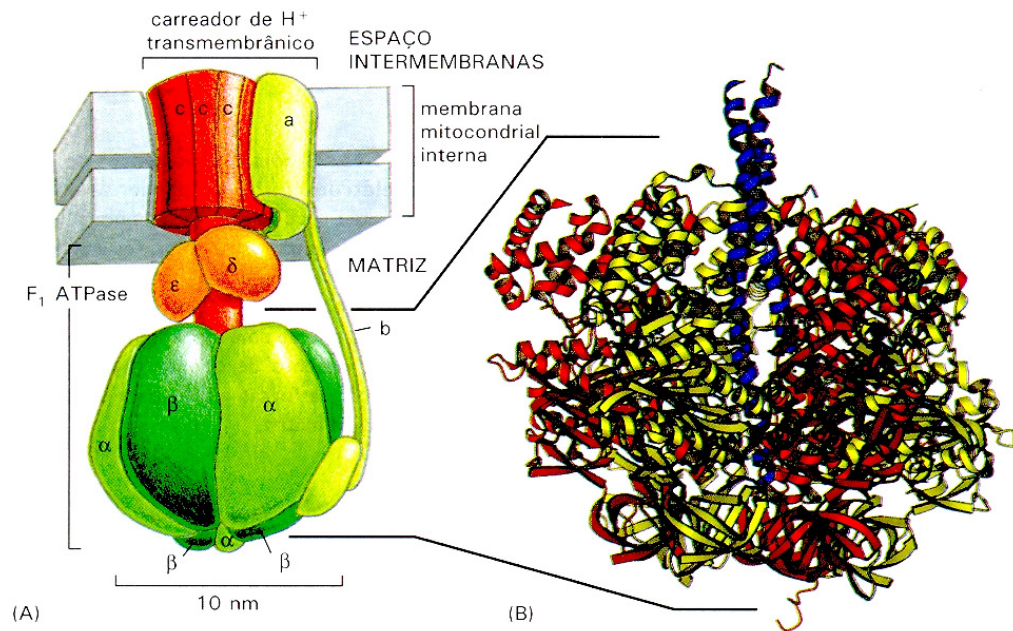


Figura 04 - (A) A enzima é composta de uma porção “cabeça”, a F_1 ATPase, e um carreador trans-membrânico de H^+ , chamado de F_0 . Uma haste rotatória gira com um rotor formado por um anel de 10 a 14 subunidades c na membrana (vermelho). O dínamo (verde) é formado por subunidades trans-membrânicas a, ligadas a outras subunidades que criam um braço alongado (B) Estrutura tridimensional da F_1 ATPase, como determinada por cristalografia de raios X (Brand et al., 2004).

Durante a fosforilação oxidativa, cada par de elétrons doados pelo NADH produzido na mitocôndria fornece energia para a formação de cerca de 2,5 moléculas de ATP. A FOx também produz 1,5 moléculas de ATP por par de elétrons de $FADH_2$ ou de moléculas produzidas pela glicólise no citosol. Dessa forma, uma molécula de glicose pode gerar, em termos de ganho líquido, aproximadamente 30 ATPs (Brand et al., 2004).

O sistema funciona sem que haja falta ou excesso de energia. Quando a utilização do ATP é baixa, há pouco ADP na matriz, pouco retorno de prótons na ATP sintase e o gradiente de prótons é mantido mais lento, retardando a atividade da cadeia respiratória (mecanismo de bombeamento), permitindo a conservação de energia. Ao contrário, se o ATP for usado ativamente, a concentração de ADP aumenta, os prótons retornam maciçamente à ATP sintase na matriz, formando ATP. Este retorno maciço dos prótons é compensado ativamente por uma extrusão aumentada destes, devido à ativação da cadeia respiratória. A elevada taxa respiratória resultante é dita ser acoplada à FOX (Fromenty & Pessayre, 1995).

A conservação de energia por este sistema pode ser impedida em diversas circunstâncias. Especificamente, drogas (como compostos fenólicos ou amino-protonados) podem carregar prótons para a matriz mitocondrial devido à sua permeabilidade através da membrana interna (contornando assim a ATP sintase) liberando, assim, prótons na matriz. Este efeito chamado de “protonfórico” diminui o potencial mitocondrial da membrana. Em consequência, isto ativar a cadeia respiratória e a energia será desperdiçada na formação de calor, ao invés de gerar o ATP (Terada, 1981; Rottenberg, 1983). Fazendo novamente analogia ao mecanismo da represa, tais drogas produziram fissuras gotejantes na represa.

A β -oxidação mitocondrial e a FOx são processos fisiológicos fundamentais para o consumo de combustível e a produção de energia. Dessa forma, não é surpresa que alterações genéticas ou adquiridas nestes processos, perturbem a função de diversos órgãos, conduzindo particularmente a um sério distúrbio hepático, a esteatose microvesicular (Fromenty & Pessayre, 1995).

2.2.3. Defeitos na cadeia respiratória mitocondrial

Defeitos na cadeia respiratória mitocondrial são causas conhecidas de insuficiência hepática precoce na infância, mas provavelmente são sub-diagnosticados, em parte devido à falta de reconhecimento e em parte, pela dificuldade de investigação (Morris, 1999). Defeitos no transporte de elétrons nesta cadeia são classificados por Sokol & Treem (1999) como desordens primárias nas hepatopatias mitocondriais, sendo que desordens secundárias estão relacionadas à injúria tóxica, metais e xenobióticos. Dentre as desordens primárias podemos destacar a síndrome de depressão de DNA mitocondrial (SDDmt), a insuficiência hepática neonatal, doença de Alper, síndrome de Pearson (medula-pâncreas), defeito na oxidação de ácidos graxos, e outras (Treem & Sokol, 1998; Sokol & Treem, 1999).

Insuficiência hepática neonatal tem sido relatada em associação à deficiência do complexo IV em inúmeras crianças, e dos complexos I e III em indivíduos de várias idades (Bioulac-Sage et al., 1993; Cormier-Daire et al., 1997). Evidências bioquímicas de insuficiência hepática (hipoglicemia, hipoalbuminemia, hiperbilirrubinemia e coagulopatia) acompanham letargia, hipotonia, vômito e baixa capacidade de sucção na amamentação (Treem & Sokol, 1998). A biópsia hepática freqüentemente mostra esteatose microvesicular e macrovesicular, com aumento da densidade, e ocasional aumento de tamanho mitocondrial na microscopia eletrônica. Colestase hepatocelular e canalicular, proliferação de ductos biliares e fibrose periportal são outras alterações presentes em variadas proporções, dependendo do estágio da doença (Treem & Sokol, 1998; Sokol & Treem, 1999).

Erros inatos do metabolismo podem alterar a transferência de elétrons e a produção de ATP pela cadeia respiratória, por geração de metabólitos tóxicos que especificamente inibem um ou mais complexos enzimáticos, ou gerar danos não-específicos na membrana mitocondrial. Deficiência da ADCL é um defeito autossômico recessivo herdado em três enzimas da β -oxidação intramitocondrial da via de oxidação de ácidos graxos. A deficiência específica da ADCL pode estar associada à insuficiência hepática neonatal ou fibrose hepática progressiva e cirrose, diferentemente de defeitos de muitas outras enzimas da oxidação de ácidos graxos, que normalmente resultam em esteatose macro e microvesicular, com discretas alterações permanentes no fígado (Treem & Sokol, 1998).

As anormalidades adquiridas da respiração mitocondrial (desordens secundárias) podem ser causadas por toxinas e drogas como o fialuridine (McKenzie et al., 1995), acúmulo de metais, como na doença de Wilson (Sokol et al., 1993), síndrome de Reye (De Vivo, 1978), etilismo (Sherlock, 1995), colestase crônica (Treem & Sokol, 1998), toxina do *Bacillus Cereus* (Mahler et al., 1997) entre muitos outros fatores. Uma importante categoria incluída nas

desordens secundárias é o amplo grupo atualmente descrito como esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). Nesta é observada esteatose micro e macrovesicular, acompanhada por variáveis graduações de alterações necroinflamatórias e fibrose portal, na ausência de alcoolismo (Sokol & Treem, 1999). Pode ser progressiva e culminar em cirrose, estando normalmente associada com obesidade, diabetes mellitus não insulino-dependente, nutrição parenteral e outras causas (Day & James, 1998b).

Embora os mecanismos responsáveis pelo acúmulo de lipídeos não estejam completamente explicados, a diminuição da oxidação, a disponibilidade e transporte aumentado no fígado e a síntese hepática aumentada de ácidos graxos provavelmente apresentam um papel significativo na patogênese da DGHNA. Vários estudos (Caldwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001; Pessayre & Fromenty, 2005; Ibdah et al., 2005; Wei et al. 2008) mostram que anomalias mitocondriais estão estreitamente relacionadas à patogênese de DGHNA, levando a hipótese de que a DGHNA seja uma doença mitocondrial. As anomalias mitocondriais associadas com a DGHNA incluem lesões ultraestruturais, depleção de DNA mitocondrial (DNAm_t), atividade diminuída dos complexos da cadeia respiratória e danos da β -oxidação mitocondrial. Mudanças morfológicas anormais nas mitocôndrias do fígado foram observadas em pacientes e nos modelos animais com EHNA (Caldwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001; Sobaniec-Lotowska & Lebensztejn, 2003; Ibdah et al., 2005; Begriche et al., 2006). A microscopia eletrônica revelou que as mitocôndrias na DGHNA são grandes e inchadas, escassas no número, e há na matriz inclusões paracristalinas e hipodensidade. Defeitos ultraestruturais nas mitocôndrias de pacientes com DGHNA podem ser indicativos de função mitocondrial defeituosa, levando, por exemplo, a atividade reduzida da cadeia respiratória mitocondrial (Perez-Carreras et al., 2003) e síntese defeituosa de ATP (Cortez-Pinto et al., 1999). A DGHNA está presente frequentemente nos pacientes com resistência à insulina, obesidade e diabetes tipo 2, algumas condições metabólicas

em que há diminuição do consumo de oxigênio e de produção de ATP, redução do DNAm_t total e da transcrição do fator A do DNAm_t e redução das proteínas respiratórias nos adipócitos, músculo e fígado (Valerio et al. 2006).

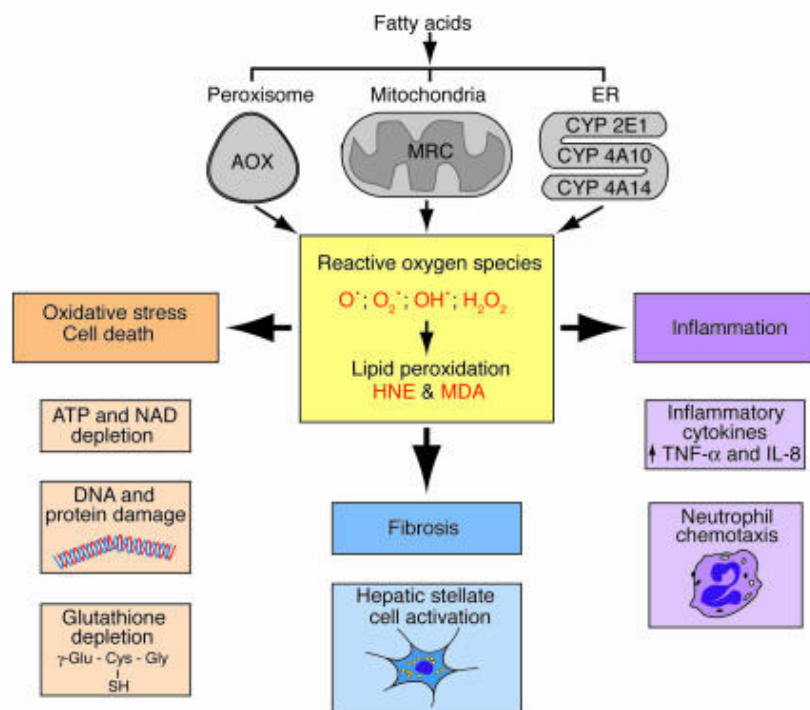


Figura 05 - Mecanismos envolvidos na lesão celular induzida por lipídios na DGHNA (Browning e Horton, 2004).

A depleção do DNAm_t nos hepatócitos inibe a função mitocondrial e causa esteatose hepática e outras injúrias hepáticas. Os pacientes com EHNA apresentam expressão diminuída dos polipeptídeos codificados pelo DNAm_t (Santamaría et al., 2003) e baixa atividade dos complexos, I, II, III, IV e V (Perez-Carreras et al., 2003). A Síndrome da Deficiência de DNAm_t, provavelmente, é a mais comum entre as desordens na cadeia respiratória da mitocôndria (Moraes et al., 1991). Pacientes que apresentam a forma hepática da SDDmt, nos primeiros 6 meses de vida mostram progressiva insuficiência hepática e freqüente envolvimento neurológico;

investigações metabólicas revelam hipoglicemia e elevados níveis de lactato nos fluídos corporais; histologia anormal do fígado inclui esteatose e fibrose progredindo para cirrose, aumento do número de mitocôndrias pleomórficas e anomalias nas cristas são relatadas (Moraes et al., 1991; Mazziotta et al., 1992; Bakker et al., 1996; Morris et al., 1998).

Mandel et al. (2001), num estudo com 10 pacientes portadores de SDDmt, verificaram que todos apresentavam esteatose microvesicular (leve a intensa) associada a alterações mitocondriais (alterações morfológicas na matriz, nas cristas e também um aumento no número total). Um proeminente aumento no número de mitocôndrias pode levar a alteração citoplasmática designada como “alteração oncocítica” ou “transformação oncocítica”, a qual se associa a várias condições, normais ou patológicas (Ghadially, 1997). De maneira semelhante Bioulac-Sage et al. (1993) verificaram, num estudo com 10 pacientes neonatos portadores de doença hepática, que apresentavam marcante esteatose microvesicular, associada à proliferação mitocondrial, com aparência oncocitótica.

Múltiplas enzimas estão envolvidas na β -oxidação mitocondrial e a deficiência destas pode conduzir ao desenvolvimento da esteatose hepática. Por exemplo, camundongos com disfunção nos genes da ADCML e ADCM manifestam defeitos em oxidação de ácidos graxos que leva, provavelmente, à esteatose hepática micro e macrovesicular. A Proteína Trifuncional Mitocondrial (PTM) é uma proteína heterotrimérica que consiste em quatro α -subunidades e quatro β -subunidades que catalisa a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa. Os defeitos na PTM nos seres humanos são herdados recessivamente, e crianças com defeitos em qualquer destas atividades enzimáticas exibem, em sua maioria, esteatose hepática microvesicular (Wei et al., 2008).

Defeitos ultraestruturais em mitocôndrias, em pacientes com DGHNA, podem ser indicativos de fosforilação oxidativa defeituosa, visto que estes pacientes apresentam reduzida

atividade na cadeia respiratória mitocondrial (Perez-Carreras, et al., 2003) e prejuízo na síntese de ATP após recusa da frutose (Cortez-Pinto et al., 1999). Tais disfunções podem levar à produção de espécies de oxigênio reativas (ERO) (Figura 05). Se a cadeia respiratória é interrompida em certos pontos, os intermediários respiratórios podem transferir elétrons para moléculas de oxigênio produzindo ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (Hensley et al., 2000). Se a capacidade oxidativa da mitocôndria permanece estagnada, ácidos graxos são acumulados no citosol. Vias alternativas são então ativadas nos peroxissomos (β -oxidação) e nos microsossomos (ω -oxidação) resultando na formação adicional de EROs (Berson et al., 1998). Na etapa inicial da β -oxidação peroxissomal, peróxido de hidrogênio é formado pela ação da acetil-CoA oxidase, que doa elétrons diretamente ao oxigênio molecular (Mannaerts et al., 2000). A oxidação microsossomal é catalisada primariamente pelas enzimas do citocromo P450 (2E1, 4A10 e 4A14), formando EROs por meio de flavoproteínas mediadoras, doando elétrons também para o oxigênio molecular (Lieber, 2004). Além disso, ácidos dicarboxílicos produzidos por esta ω -oxidação podem impedir a função mitocondrial por desacoplamento da fosforilação oxidativa (Tonsgard & Getz, 1985). O efeito cumulativo da oxidação de ácidos graxos extra-mitocondrial é um aumento adicional no stress oxidativo e estagnação da função mitocondrial (Browning & Horton, 2004).

Inúmeros mecanismos podem ser considerados para explicar a deficiência orgânica mitocondrial encontrada na DGHNA em pacientes ou em modelos animais. Os mecanismos possíveis incluem:

- (a) produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO)
- (b) expressão aumentada de TNF- α
- (c) expressão alterada de PGC-1

2.2.3.1. Espécies reativas de oxigênio

A deficiência orgânica na cadeia respiratória mitocondrial (CRM) pode diretamente conduzir à produção de EROs. Se o fluxo de elétrons é interrompido em qualquer momento na cadeia respiratória, os componentes intermediários podem transferir elétrons ao oxigênio molecular para produzir os ânions superóxido e água oxigenada (Garcia-Ruiz et al. 1995; Hensley et al., 2000). Malondialdeído e 4 hidroxinonenal, dois sub-produtos da peroxidação de lipídios, podem inibir a citocromo c oxidase mitocondrial, formando um complexo com esta enzima. A depleção no DNAm induzida por EROs pode implicar diminuição numérica e funcional das mitocôndrias levando a esteatose e lesões no fígado (Demeilliers et al., 2002). Tal depleção pode estagnar a síntese dos complexos, I, III, IV e V da CRM porque, como citado anteriormente, o DNAm codifica 13 dos polipeptídeos desta cadeia.

2.2.3.2. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α , Tumoral Necrosis Factor- α)

Um outro fator importante a considerar na patogênese da deficiência orgânica mitocondrial é TNF- α . Elevados níveis séricos de TNF- α foram encontrados nos pacientes com EHNA (Perez-Carreras et al., 2003; Kugelmas et al. 2003; Hui et al., 2004). As fontes prováveis do TNF- α hepático são os próprios hepatócitos e as células de Kupffer (Crespo et al., 2001). O TNF- α induz inchaço mitocondrial, tornando a matriz mais clara e com perda de septos. Este inchaço causa um rompimento na condução da membrana mitocondrial, levando a uma interferência entre os complexos I e III da CRM (Higuchi et al. 1998; Sanchez-Alcazar et al., 2005).

2.2.3.3. Coativador do γ -receptor do Proliferador ativo-1 (PGC-1, Proliferador-activated γ -receptor Coactivator-1)

Os receptores nucleares são reguladores pleiotrópicos do metabolismo glicolítico e oxidativo (Mangelsdorf et al., 1995). A atividade mitocondrial é controlada transcricionalmente, em parte, pelos receptores nucleares e pelo Coativador do γ -receptor do Proliferador ativo 1 (PGC-1, Proliferador-activated γ -receptor Coactivator-1) do peroxissomo- família protéica relacionada com PGC-1 α e PGC-1 β (Lin et al., 2005; Finck & Kelly, 2006). PGC-1 α e PGC-1 β são expressos preferencialmente nos tecidos com capacidade oxidativa elevada, como o coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom, onde são críticos na regulação da capacidade funcional mitocondrial e do metabolismo energético celular (Kamei et al., 2003; Lin et al., 2002; St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999). O PGC-1 α , potencialmente, induz a expressão dos genes implicados na homeostase da energia em várias células por meio de reguladores mitocondriais, conhecidos como receptores estrógeno-relacionados (RER), receptor δ proliferador-ativado peroxissomal ou fator respiratório nuclear (NRF-1, 2 – nuclear respiratory factor-1, 2) (Lin et al., 2005; Finck & Kelly, 2006). A hiper-expressão de PGC-1 α em células de músculo esquelético conduz a um aumento no gasto energético e biogênese mitocondrial (St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999), visto que a perda de PGC-1 α conduz a um desempenho reduzido do músculo, defeitos cardíacos e outros defeitos metabólicos (Lin et al., 2002; Lin et al., 2004). O fígado expressa baixos níveis de PGC-1 α e de PGC-1 β em condições normais, entretanto, sua expressão é aumentada no jejum (Herzig et al., 2001; Yoon et al., 2001; Lin et al., 2003).

2.3. MECANISMOS DA ESTEATOSE HEPÁTICA

Como descrito anteriormente, embora os mecanismos responsáveis pela esteatose hepática na EHNA ainda não estejam inteiramente elucidados, o aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres (AGL) no fígado e aumento da síntese hepática de ácidos graxos podem apresentar um papel fundamental nesta disfunção. Além disso, na EHNA foi observada diminuição da secreção hepática de apo B, embora sem relação direta com aumento ou diminuição da secreção hepática de triglicérides (Begriche et al., 2006).

A disponibilidade aumentada de ácidos graxos no fígado colabora para o desenvolvimento de esteatose em pacientes com diabetes tipo 2. Normalmente, a insulina bloqueia a lipólise do tecido adiposo devido à inibição da lipase hormônio-sensível (Salway, 1994). Esta enzima hidrolisa o triacilglicerol em duas moléculas de ácidos graxos e de monoacilglicerol, que é então hidrolizado por outra lipase em glicerol e ácido graxo (Salway, 1994). Normalmente, os adipócitos de indivíduos magros e insulino-sensíveis, armazenam a gordura após refeições e liberam então ácidos graxos durante períodos de jejum. Ao contrário, os adipócitos de indivíduos obesos ou insulino-resistentes, mantêm liberação contínua de grandes quantidades de glicerol e de ácidos graxos na circulação, situação que ocorreria normalmente somente durante o jejum (Gorden, 1960). Como os ácidos graxos são prontamente levados aos hepatócitos, a resistência à insulina aumenta extremamente a quantidade de ácidos graxos disponíveis ao fígado (Begriche et al., 2006).

Não somente os AGL em excesso no plasma são levados ao fígado, mas também passam a ser sintetizados mais ativamente neste órgão. Certamente, os níveis aumentados de insulina e glicose estimulam a síntese do ácido graxo e triacilglicerol. A insulina aumenta os níveis de SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*) e de PPAR γ (*peroxisome*

proliferator-activated receptor γ), dois fatores da transcrição que ativam a expressão de enzimas-chaves envolvidas na lipogênese (Shimomura et al., 1999; Matsusue et al., 2003). SREBP-1c e PPAR γ aumentam a expressão da citrato-liase, da acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase, que estão envolvidas na síntese de ácidos graxos. Estes fatores de transcrição estimulam a expressão da glicerol-3-fosfatoaciltransferase e do e estearoil-CoA desaturase 1 que promovem a formação e deposição de triacilglicerol (Shimomura et al., 1999). Estudos em ratos geneticamente obesos ob/ob mostraram um aumento na quantidade de SREBP-1c ativo na transcrição e um aumento na síntese de ácidos graxos no fígado, sugerindo que lipogênese é um mecanismo chave que conduz à esteatose maciça nestes ratos (Shimomura et al., 1999). Os níveis aumentados de glicose podem ativar o ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein), um fator da transcrição que ativa a expressão de enzimas fundamentais da glicólise e da lipogênese (Dentin et al., 2004; Iizuka et al., 2004, Begriche et al., 2006).

A EHNA é também caracterizada, ao menos em alguns indivíduos, pela diminuição da saída de apo B do fígado. Evidências recentes sugerem que a secreção hepática de apolipoproteína B no plasma pode ser um distúrbio primário na EHNA (Charlton et al., 2002; Musso et al., 2003), sendo que redução no RNAm hepático da apo B foi documentado em diversos pacientes com EHNA (Sreekumar et al., 2003), sugerindo que diminuição da síntese de apo B na EHNA poderia ser causada, ao menos em partes, à transcrição diminuída e/ou à estabilidade diminuída do RNAm desta. É possível que a hiperinsulinemia tenha influência neste mecanismo, pois a insulina diminui a síntese e a estabilidade da apo B (Taghibiglou et al., 2000; Charlton et al., 2002). A síntese e/ou secreção hepática diminuídas de apo B na EHNA podem estar associadas a concentrações reduzidas ou aumentadas de apo B no plasma e a níveis elevados de triglicérides no plasma (Charlton et al., 2002; Musso et al., 2003). Assim, o metabolismo da

lipoproteína é afetado de maneira complexa no fígado, mas também em tecidos extra-hepáticos (Begrache et al., 2006).

3. OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Avaliar e caracterizar a esteatose hepática de causa não definida em grupo pediátrico, por meio de análise morfológica (microscopia de luz e eletrônica) e morfométrica do tecido hepático, com ênfase nas alterações mitocondriais.

Objetivos Específicos:

- Realizar estudo minucioso da esteatose hepática de causa não determinada em grupo pediátrico, por meio de microscopia de luz;
- Estabelecer, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, parâmetros de dimensão e densidade de mitocôndrias em grupo controle, com idade semelhante, para caracterização de alterações no grupo de estudo;
- Caracterizar e comparar com o grupo controle, alterações mitocondriais em hepatócitos esteatóticos dos pacientes selecionados para o estudo;
- Relacionar os resultados obtidos por meio de microscopia eletrônica aos de microscopia de luz, buscando elementos que permitam o diagnóstico de esteatose pura;
- Relacionar os resultados obtidos por meio de microscopia de luz e eletrônica de transmissão com os achados laboratoriais dos pacientes;

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DOS PACIENTES E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes foram retrospectivamente identificados por busca numa base de dados (fichas específicas de biópsias hepáticas) do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, entre os anos de 1993 e 2007, incluindo-se apenas casos que tivessem também material previamente colhido para microscopia eletrônica, visto que a recuperação por meio de desparafinização de material emblocado gera fortes artefatos técnicos que inviabilizam o estudo de organelas. A idade máxima para a inclusão dos pacientes foi de 14 anos (Grupo Controle), sendo que no Grupo de Estudo variou de 3 meses a 12 anos e 9 meses. O IMC variou entre 12,8 e 21,6 kg/m². Todas as biópsias hepáticas pré-selecionadas foram revisadas, tendo sido selecionados apenas os casos em que a esteatose ocupasse área igual ou superior a 5% do fragmento tecidual.

Foram excluídos os casos nos quais houvesse alguma causa que justificasse a presença de esteatose, mesmo em momento mais tardio, ao se consultar os prontuários. Neste sentido foram excluídos pacientes obesos e/ou diabéticos e todos os casos relacionados a erros inatos do metabolismo, hepatite viral ou auto-imune, uso de nutrição parenteral total, doença de Wilson e outras. Não houve nenhum caso de consumo de álcool. Todos os pacientes (Grupo Controle e de Estudo) apresentaram glicemia normal.

Foram pré-selecionados aproximadamente 50 pacientes, porém, após a utilização dos critérios de exclusão, apenas 16 pacientes perfazendo 18 biópsias (um paciente foi submetido a três biópsias) permaneceram no Grupo de Estudo.

O Projeto de Pesquisa que originou esta Tese de Doutorado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, de acordo com o

PARECER PROJETO n° 523/2004, homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de novembro de 2004.

4.2. GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi composto por biópsia hepática obtida de 10 pacientes com idade entre 1 e 14 anos, não obesos, cujo diagnóstico, tanto pela microscopia óptica como pela microscopia eletrônica, tenha sido de normalidade. As indicações para a biópsia hepática neste grupo foram as mesmas de alguns pacientes do Grupo de Estudo, ou seja, vaga dor abdominal, ou mínima hepatomegalia associada a leve e constante aumento das enzimas hepáticas.

4.3. PREPARAÇÃO DO MATERIAL A SER OBSERVADO EM MICROSCOPIA DE LUZ (ML) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para as duas técnicas, os fragmentos hepáticos foram obtidos por biópsia per-cutânea. Para ML os fragmentos foram fixados por imersão em solução de formalina a 10% por no mínimo 24 h, desidratados em gradiente crescente de etanol, diafanizados em xilol PA e incluídos em parafina histológica conforme Tabela 06 (Anexo 01). Após inclusão do material em formas específicas, as secções de 5 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM 2135) e os cortes submetidos a processamento rotineiro (Tabela 07, Anexo 01), e as lâminas foram coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), tricrômio de Masson, impregnação pela prata (método de Gomori), Azul da Prússia (coloração de Perls) e PAS (Ácido Periódico de Schiff) com e sem diastase (Quadro 03 - Anexo 01).

Os fragmentos processados para MET foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M pH 7.4 durante 24 h à 4°C , pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1,0% por 2 h, e processados em gradiente crescente de soluções de acetona (da 30% a 100%) em temperatura ambiente (Tabela 08, Anexo 01). A resina utilizada para inclusão foi araldite 502. Secções semi-finas (0,5 µm) foram obtidas em ultramicrotomo (Leica – Ultracut UCT) e coradas em azul de toluidina e as secções ultrafinas (70-80nm), também obtidas com auxílio do ultramicrotomo, depositadas sobre telas de cobre (200 mesh), foram contrastadas em acetato de uranila 2,0 % diluída em solução de sacarose 9.0% por 20 min. e citrato de chumbo 2,0 % por 20 min. para posterior observação (à 60 kVA) no microscópio eletrônico LEO 906 (Zeiss).

4.4. ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

Após análise das lâminas em microscópio de luz (Zeiss – Axiophot), as imagens foram capturadas com câmera digital (Canon – PowerShot G5) acoplada ao microscópio e utilizadas para a determinação da intensidade de esteatose a partir de dois parâmetros:

- a) Determinação semi-quantitativa da intensidade da esteatose total (macro e microvesicular), com classificação de 1 a 4, sendo 1: tecido afetado em até 25% pela esteatose; 2: 25 a 50%; 3: 50 a 75% e 4: 75 a 100%. A análise foi realizada por meio da mensuração da área de esteatose em relação à área total do fragmento de biópsia hepática presente na lâmina histológica. Foi utilizado para realização da medida o programa TPS Dig versão 1.30.
- b) Estimativa da porcentagem de hepatócitos afetados pela esteatose microvesicular em relação aos hepatócitos afetados pela macrovesicular. A análise foi realizada por meio

da contagem das células que apresentaram esteatose microvesicular e das células que apresentaram esteatose macrofotocular na biópsia hepática, com posterior cálculo do percentual. Foi utilizado para auxílio da contagem o programa TPS Dig versão 1.30.

Toda a superfície dos fragmentos contidos nas lâminas histológicas foi utilizada para a realização das análises descritas acima. Optou-se, para a determinação do percentual do tipo de esteatose, a realização da contagem das células uma vez que este procedimento seria mais preciso, evitando-se distorções geradas pelo grau de esteatose total. As micrografias utilizadas para a realização da contagem estavam em aumento tal que permitisse a identificação dos limites celulares, bem como a presença e posição do núcleo foram utilizados como parâmetros auxiliares.

4.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MITOCÔNDRIAS

Após análise das secções ultrafinas no microscópio de transmissão, as imagens foram capturas (digitalizadas) por meio de placa de captura (ProLink - Pixel View USB 2.0). Para cada paciente, um bloco de tecido hepático foi analisado, sendo que dois parâmetros foram avaliados:

- a) densidade mitocondrial por hepatócito, em que se realizou a quantificação destas em 10 células, na ampliação de 1.670x, obtendo-se um número médio por paciente. Foi utilizado para auxílio da contagem o programa TPS Dig versão 1.30.
- b) área mitocondrial, obtida pela determinação da área de cada mitocôndria existente em 10 campos ($150 \mu\text{m}^2$), possibilitando a mensuração de em média 100 mitocôndrias, capturados na ampliação de 6.000x. Os campos foram selecionados aleatoriamente em regiões equidistantes da secção e a análise das imagens capturadas foi realizada em “duplo-cego”. Foi utilizado para realização da medida o programa TPS Dig versão 1.30.

Para padronização da análise morfométrica, foi realizada amostragem não-probabilística, havendo inacessibilidade à toda população, pois a população objeto seria células e/ou mitocôndrias de todas as regiões/lóbulos hepáticos, o que seria inviável devido tratar-se de estudo retrospectivo e de não ser procedimento padrão clínico-laboratorial a realização de biópsia em toda a extensão do órgão. Assim a população amostrada está compreendida dentro da população objeto, e como as características da variável da população de interesse apresentam as mesmas da população objeto, espera-se que a amostragem tenha equivalência a uma amostragem probabilística. A técnica para a realização da amostragem foi a casual simples, o que equivale a um sorteio numérico, ou seja, seleção ao acaso em regiões equidistantes da grade e sempre se utilizando, para o grupo de estudo, células que apresentassem esteatose. Cabe destacar que outros relatos da literatura utilizaram amostragem de campos semelhantes ao do presente estudo: Murray et al. (1981) utilizaram 09 campos por animal, Yang e Makita (1998) utilizaram 15 campos por animal (com ampliação de 9000x) e Le et al. (2004) utilizaram 16 campos para análise morfométrica. Em ambos os casos deve-se considerar o n (pacientes) e a significância ou não dos resultados: de acordo com a análise estatística, considerando-se um poder do teste de 80%, $\alpha=0,05$ e diferença a ser detectada de 01 desvio-padrão (no caso de ANOVA), concluiu-se que um n mínimo de 06 pacientes seria suficiente, valor este, inferior ao contido no presente estudo.

Com base nos resultados obtidos na microscopia de luz, os pacientes do Grupo de Estudo foram subdivididos em dois sub-grupos: Esteatose Microvesicular e Esteatose Macrovesicular. A diferença entre estes dois grupos e destes em relação ao Grupo Controle foi comparada por ANOVA com transformação por pontos, sendo considerados significativos os valores de $p<0,05$.

4.6. LEVANTAMENTO DE DADOS LABORATORIAIS E CLÍNICOS DOS PACIENTES

Os prontuários de todos os pacientes foram cuidadosamente investigados. Nestes buscamos critérios necessários para inclusão e exclusão, bem como colhemos dados necessários para a avaliação dos resultados. Foram seguintes os dados obtidos: sexo, idade, peso, altura, dosagens de Alanino-aminotransferase (ALT), Aspartato-aminotransferase (AST), Gama-glutamiltransferase (GGT), Colesterol total, Triglicerídeos e Glicemia, tanto ao longo do acompanhamento, como à época da biópsia (Valores na Tabela 05 - Resultados).

Especificamente, em um dos pacientes em que foram realizadas três biópsias consecutivas num período de quatro anos, acrescentamos as imagens ultrassonográficas, uma vez que estas ilustram bem as alterações observadas neste caso.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA DE LUZ

A análise em microscopia de luz no nosso Grupo de Estudo mostrou graus diferentes de esteatose total, bem como variável percentual de esteatose microvesicular em relação à macrovesicular. A tabela 01 mostra os valores obtidos na análise morfométrica, tendo em vista que os pacientes foram subdivididos em duas categorias: pacientes com predomínio de esteatose microvesicular (% de esteatose microvesicular/macrovesicular > 50%) e pacientes com predomínio de esteatose macrovesicular (% de esteatose microvesicular/macrovesicular $\leq$ 50%).

A figura 06 evidencia as imagens obtidas para a realização das análises quantitativas em microscopia de luz. Observar nas micrografias A, B, C e D os diferentes graus de esteatose total sendo, respectivamente, graus 1, 2, 3 e 4. Também é possível verificar-se a variação do percentual de esteatose microvesicular em relação à macrovesicular, em que se observa 5% em D, 25% em E, 40% em B, 60% em F, 70% em A e 75% em C. Como a grande maioria dos pacientes apresentou alto percentual de esteatose, não foi possível se determinar em que zona acinar esta foi mais acentuada, uma vez que praticamente toda a superfície da secção se mostrava preenchida pela esteatose.

Tabela 01 - Resultado das análises morfométricas em microscopia de luz com relação ao grau de esteatose total e percentual de esteatose microvesicular em relação à macrovesicular.

Grupo	Amostra	Esteatose Total	Esteatose microvesicular
Predomínio macrovesicular	01	4	40 %
	03	3	45 %
	08	4	20 %
	11	4	25 %
	12	4	48 %
	14	2	42 %
	18	4	5 %
Predomínio microvesicular	02	4	55 %
	04	3	70 %
	05	1	70 %
	06	3	70 %
	07	3	75 %
	09	3	70 %
	10	3	75 %
	13	4	59 %
	15	4	80 %
	16	2	95 %
	17	3	75 %

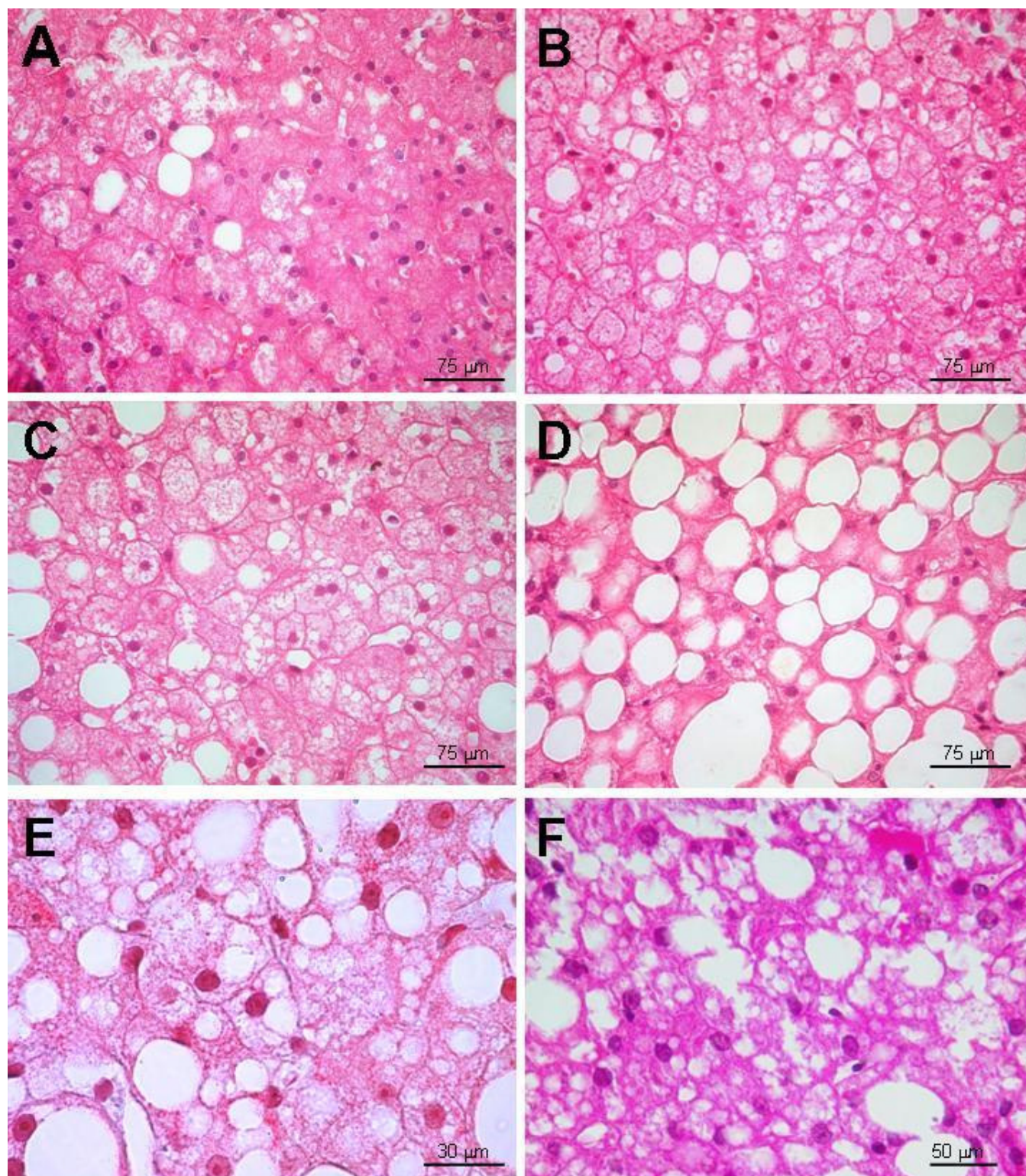


Figura 06 - Micrografias das biópsias hepáticas em microscopia de luz. **A:** a imagem da amostra 5, com grau 1 de esteatose total e 70 % de esteatose microvesicular. **B:** a imagem da amostra 14, com grau 2 de esteatose total e 40 % de esteatose microvesicular. **C:** a imagem da amostra 10, com grau 3 de esteatose total e 75 % de esteatose microvesicular. **D:** a imagem da amostra 18, com grau 4 de esteatose total e 5 % de esteatose microvesicular. **E:** a imagem da amostra 11, com grau 4 de esteatose total e 25% de esteatose microvesicular. **F:** a imagem da amostra 13, com grau 4 de esteatose total e 60% de esteatose microvesicular. Hematoxilina e Eosina.

Com relação às colorações especiais (TM, Perls, Gomori e PAS), em nenhum dos pacientes foi observada fibrose ou qualquer tipo de depósito nos hepatócitos ou células de Kupffer (Figura 07).

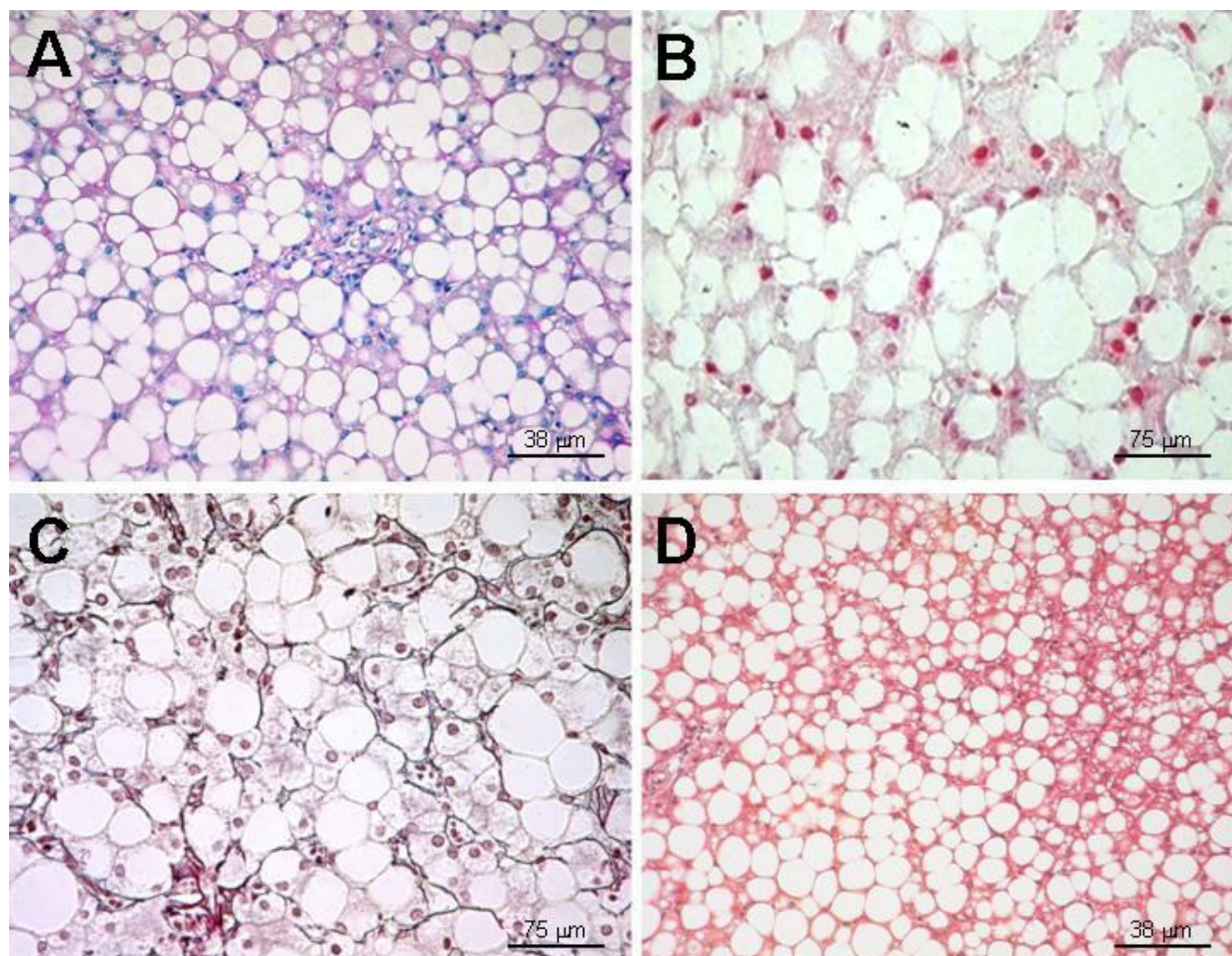


Figura 07 - Micrografias das colorações especiais. A: PAS sem diastase, com ausência de positividade para mucoproteínas e/ou mucopolissacárides. B: Coloração de Perls evidenciando ausência de depósitos de ferro e bilirrubina. C: Impregnação para fibras reticulínicas mostrando o arcabouço reticular normal do tecido hepático. D: Tricrômio de Masson, evidenciando ausência de fibrose.

5.2. PADRONIZAÇÃO DE ÁREA E DENSIDADE MITOCONDRIAL HEPÁTICA EM GRUPO INFANTIL

Para realização das análises morfométricas foi imprescindível a composição de um Grupo Controle em que fosse possível obter a área e o volume mitocondrial como padrão de comparação para os Grupos de Estudo. O tamanho das mitocôndrias presentes nos hepatócitos, conforme descrito anteriormente (Phillips et al., 1987) varia de acordo com a região em que o hepatócito se encontra (região periportal ou centrolobular). No entanto, devido ao diminuto fragmento de tecido utilizado para a obtenção das secções ultrafinas, não é possível se determinar em que região do fígado o hepatócito está presente. Desta maneira, a amostragem foi realizada aleatoriamente, buscando mitocôndrias de diversos hepatócitos distribuídos por toda a superfície da secção. Nessa perspectiva, a área mitocondrial utilizada como padrão foi uma média geral de todas as mitocôndrias mensuradas nos pacientes do Grupo Controle.

A mitocôndria apresenta formato cilíndrico ou arredondado, sendo a área média, independente de seu formato, aferido em $1,52 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$. A densidade mitocondrial, referente a um plano de corte medial foi determinado em 72 ± 7 mitocôndrias/hepatócito.

5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Na análise ultraestrutural, foi observada morfologia normal das mitocôndrias do Grupo Controle, com preservação das cristas mitocondriais e do formato (Figura 8A). Nos pacientes do grupo com esteatose macrovesicular não foi evidenciado qualquer alteração significativa quanto às dimensões e aspectos estruturais (Figura 8B).

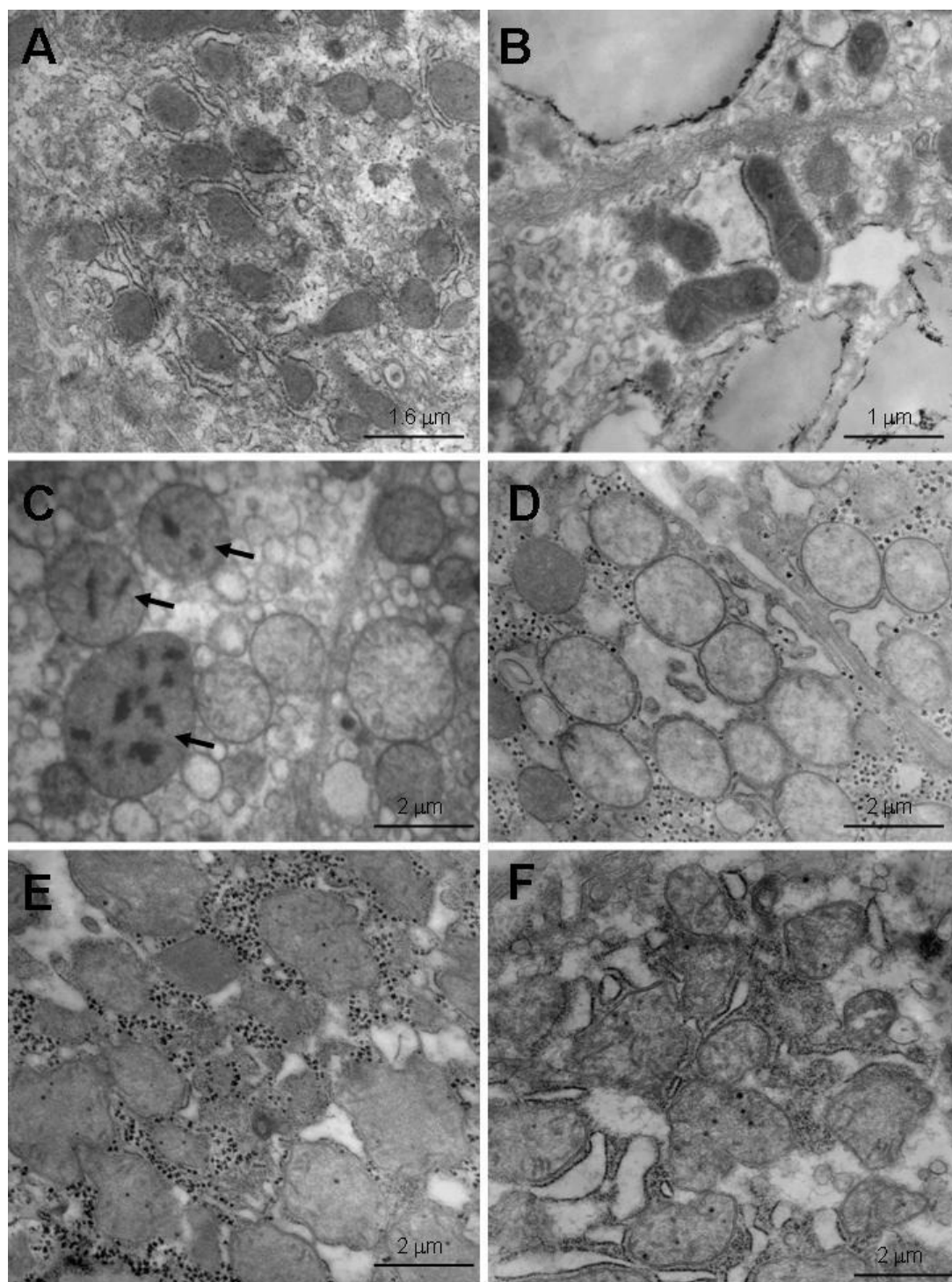


Figura 08 - Micrografias eletrônicas das biópsias hepáticas evidenciando a dimensão mitocondrial. A: perfil mitocondrial de paciente do grupo controle. B: mitocôndrias de paciente do grupo com esteatose macrovesicular. C: mitocôndrias de elevadas dimensões (megamitocôndrias) de paciente do grupo com esteatose microvesicular. D: mitocôndrias apresentando inclusões cristalinas em paciente do grupo com esteatose microvesicular. E: mitocôndrias apresentando formato irregular, diminuição de eletrondensidade e atenuação das cristas mitocondriais em paciente do grupo com esteatose microvesicular. F: mitocôndrias apresentando contorno irregular em paciente do grupo com esteatose microvesicular.

No entanto, no grupo com esteatose microvesicular, a alteração morfológica mais evidenciada foi a grande incidência de megamitocôndrias (Figura 8C). Estas mitocôndrias de elevadas dimensões apresentavam, com frequência, inclusões cristalinas (Figura 8C) e formato irregular (43% das amostras dos pacientes com predomínio de esteatose microvesicular) (Figura 8E e 8F). Em muitos pacientes deste mesmo grupo, observamos mitocôndrias com alterações degenerativas, tais como diminuição de eletrondensidade e atenuação das cristas (Figura 8E). A análise da área mitocondrial média mostrou diferença significativa entre o grupo com esteatose microvesicular comparado ao grupo controle e ao grupo com esteatose macrovesicular (Figura 09). A tabela 02 evidencia a área mitocondrial média para cada amostra bem como o respectivo desvio padrão.

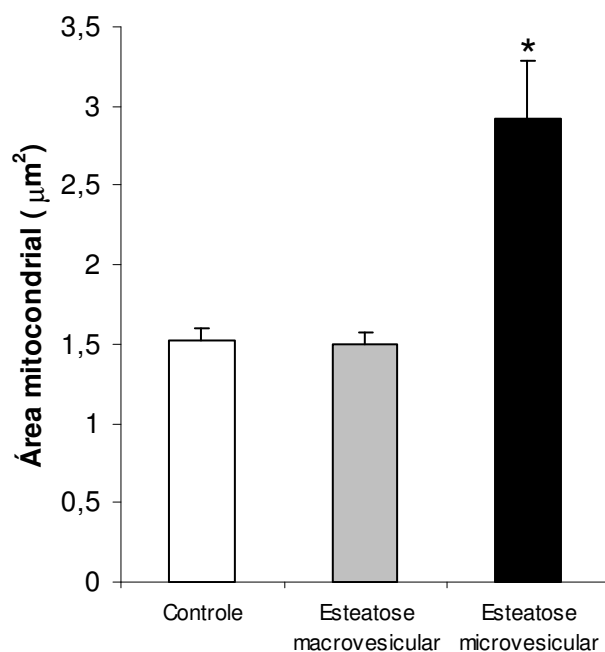


Figura 09 - Representação gráfica da análise morfométrica de área mitocondrial média dos pacientes do grupo controle, grupo com esteatose macrovesicular e com esteatose microvesicular. Os valores de área estão expressos em μm^2 e foram comparados estatisticamente por ANOVA com transformação de pontos, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Barra de erro representando o valor do erro padrão.

Tabela 02: Valores da área mitocondrial média para cada amostra e respectivo desvio padrão dentro dos grupos Esteatose Macrovesicular predominante, Esteatose Microvesicular predominante e Controle.

Grupo	Paciente	Área Mitocondrial (μm^2)	Desvio Padrão
Esteatose Macrovesicular	1	1,85	0,85
	3	1,68	0,90
	8	1,83	0,79
	11	1,56	0,86
	12	1,79	0,84
	14	1,50	0,67
	18	1,30	0,57
Esteatose Microvesicular	2	5,12	2,43
	4	1,78	0,84
	5	1,32	0,65
	6	3,47	1,58
	7	2,04	0,80
	9	4,46	1,42
	10	3,70	1,56
	15	2,24	0,87
	13	3,74	1,60
	16	3,44	1,39
	17	2,43	0,88
Grupo Controle	19	1,85	0,92
	20	1,35	1,08
	21	1,48	0,68
	22	1,51	0,59
	23	1,52	0,62
	24	2,04	0,85
	25	1,87	0,82
	26	1,75	0,76
	27	1,44	0,48
	28	1,63	0,63

Com relação à densidade mitocondrial observou-se uma relativa variação no número destas organelas nos pacientes do grupo com esteatose, seja macrovesicular (Figura 10B) ou microvesicular (Figura 10C), não havendo diferenças significativas entre estes grupos, ou destes com o grupo controle (Figura 10A). A Figura 11 mostra graficamente o resultado da análise quantitativa para a densidade mitocondrial.

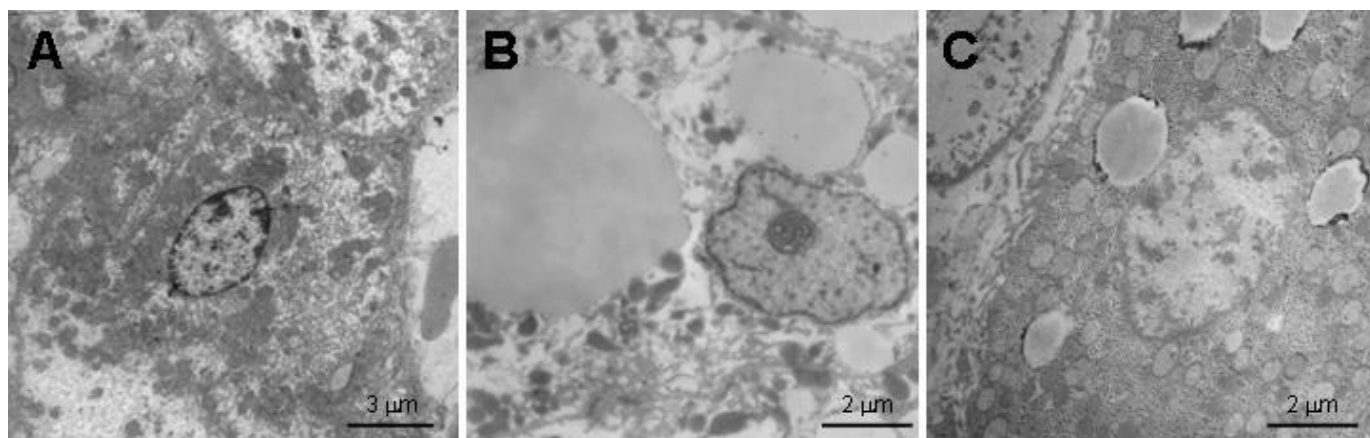


Figura 10 - Micrografias eletrônicas dos hepatócitos evidenciando a densidade de mitocôndrias. A: hepatócito de paciente do grupo controle. B: Hepatócito de paciente com esteatose macrovesicular. C: Hepatócito de paciente com esteatose microvesicular.

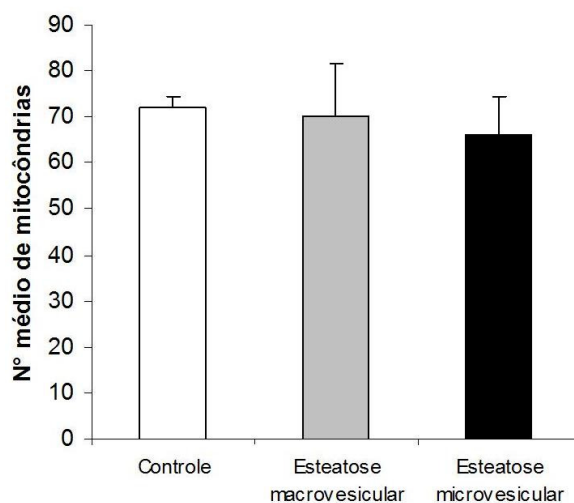


Figura 11 - Representação gráfica da análise morfométrica de densidade mitocondrial dos pacientes do grupo controle, grupo com esteatose macrovesicular e com esteatose microvesicular. Os valores de estão expressos em número de mitocôndrias e foram comparados estatisticamente por ANOVA com transformação de pontos, não havendo diferenças significativas entre os valores ($p > 0,05$). Barra de erro representando o valor do erro padrão.

5.4. DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

A partir das informações constantes nos prontuários dos pacientes, foi confeccionada a tabela abaixo (Tabela 03) contendo os dados clínicos e laboratoriais mais relevantes e relacionados às alterações hepáticas (esteatose). No grupo de pacientes com esteatose macrovesicular predominante 57% das amostras apresentaram elevação das transaminases, 29% elevação nos níveis séricos de colesterol e 43% elevação de triglicerídeos. No grupo com predomínio de esteatose microvesicular 55% das amostras apresentaram elevação das aminotranferases, 18% elevação dos níveis de colesterol e 64% elevação de triglicerídeos. Todos os pacientes (Grupo Controle e de Estudo) apresentaram glicemia normal. Na tabela 04 é possível observar os valores médios dos principais parâmetros analisados, bem como desvio padrão e o valor de p (teste t não-pareado). Notar que não há diferença significativa entre os dois grupos de esteatose em nenhum dos parâmetros.

Tabela 03 - Descrição dos parâmetros avaliados nos 18 pacientes do grupo de estudo. (ni: não incluído; a: anos; m: meses; F: feminino; M: masculino; ALT: alanino aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; GGT: gama-glutamil transpeptidase; Colest: colesterol total; Triglic: triglicerídeos). Valores de referência: ALT < 40 U/I, AST < 37 U/I, GGT < 40 U/I, Colesterol < 200 mg/dl e Triglicérides < 120 mg/dl. Os valores de referência do IMC estão descritos nas figuras 15 e 16 (Anexo 01).

Grupo	Amostra	Idade	Sexo	IMC (Kg/m ²)	AST (U/I)	ALT (U/I)	GGT (U/I)	Colest (mg/dl)	Triglic (mg/dl)
Esteatose macrovesicular	01	1a 11m	F	18,7	20	72	ni	134	46
	03	11a	M	21,6	68	99	28	219	109
	08	1a 2m	M	15,7	73	48	39	216	172
	11	5m	M	14,6	87	386	554	131	347
	12	1a 1m	M	17,5	25	25	37	146	51
	14	4a 6m	M	15,9	47	48	20	ni	34
	18	6m	F	13,5	119	204	585	133	476
Esteatose microvesicular	02	10m	F	15,7	75	71	ni	216	1330
	04	6a	F	14,3	304	104	340	103	516
	05	3a 8m	F	14,9	24	17	15	172	54
	06	1a 1m	M	17,0	75	50	384	144	152
	07	5m	F	12,8	242	151	ni	ni	ni
	09	3m	M	ni	14	19	212	182	421
	10	4m	F	13,7	37	63	197	172	455
	13	2a	M	16,5	26	22	50	156	54
	15	10 m	M	15,8	47	53	31	105	87
	16	11a 1m	M	14,7	20	18	ni	166	75
	17	12a 9m	M	ni	39	63	257	281	286

Tabela 04 – Comparativo dos valores médios dos parâmetros bioquímicos para cada grupo de estudo. Os valores de AST, ALT e GGT estão representados em número de vezes do aumento em relação ao limite de normalidade e colesterol total e triglicérides em mg/dl (média $\pm$ desvio padrão). Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t não-pareado, considerando-se significativo valor de $p < 0.05$ (valores de referência: colesterol total 200 mg/dl e triglicérides 120 mg/dl).

	Esteatose Microvesicular	Esteatose Macrovesicular	<i>p</i>
AST	1,7 $\pm$ 0,94	2,24 $\pm$ 2,64	0.6258
ALT	3,14 $\pm$ 3,23	1,43 $\pm$ 1,04	0.1171
GGT	5,26 $\pm$ 7,0	4,64 $\pm$ 3,54	0.8370
Colesterol	163,2 $\pm$ 42,4	169,7 $\pm$ 51,8	0.7988
Triglicérides	176,4 $\pm$ 171,5	343,0 $\pm$ 389,7	0.3708

5.5. ANÁLISE DO PERFIL DA ESTEATOSE HEPÁTICA E DAS ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS EM PACIENTE SUBMETIDO A TRÊS BIÓPSIAS SEQUENCIAIS

Dentre a delimitação do Grupo de Estudo, foi verificada a existência de um paciente submetido a três biópsias hepáticas sequenciais denominadas Casos 12, 13 e 14 nas Tabelas 01, 02 e 03. Em exame médico periódico foi identificado aumento das dimensões do fígado no paciente, que na época apresentava 13 meses de idade, sendo acompanhado periodicamente para investigação mais aprofundada. De acordo com os pais, a criança era completamente assintomática, seus hábitos alimentares eram normais, não havendo histórico de contacto com produtos químicos ou tóxicos e hábito intestinal era regular. A ultrassonografia (Figura 12) revelou hepatomegalia sugestiva de esteatose hepática. O paciente permaneceu assintomático, porém devido a persistente hepatomegalia realizou uma biópsia inicial em 2000, com diagnóstico de esteatose macro e microvesicular difusas. O acompanhamento do paciente continuou durante 5 anos, a fim de investigar possíveis causas de esteatose. Todas as outras causas conhecidas de

esteatose foram excluídas e mais duas biópsias foram realizadas durante esse mesmo período (2001 e 2004), no sentido de se afastar eventual progressão para fibrose. Em ambas as biópsias, os achados histológicos foram semelhantes aos da primeira biópsia. No entanto, no último exame constatou-se esteatose total de menor intensidade. Durante o período em que foram realizadas as biópsias, nenhum tratamento foi instituído, o que poderia justificar esta diminuição da esteatose.

Na figura 13 é possível observar predomínio de esteatose microvesicular nas biópsias realizadas em 2000 e 2001 (13B e 13D), com redução da mesma e da esteatose total em 2004 (figura 13F). Os valores referentes à morfometria, bem como aos dados clínicos do paciente estão descritos na tabela 05. Um perfil semelhante pode ser observado na figura 14, onde se verifica ligeiro aumento nas dimensões das mitocôndrias na biópsia realizada em 2000 (figura 13A), porém há um aumento significativo em 2001 (figura 13C) e diminuição (valores semelhantes aos do grupo controle) em 2004 (figura 13E). No que diz respeito à densidade mitocondrial, não foi observada diferença significativa nos resultados das biópsias realizadas nos três períodos de tempo, assim como entre o valor médio do grupo controle. A densidade mitocondrial média nas biópsias realizadas em 2000, 2001 e 2004 foram 53, 46 e 59 mitocôndrias por célula, respectivamente, sendo que o número médio foi de 74 mitocôndrias por célula no grupo controle.

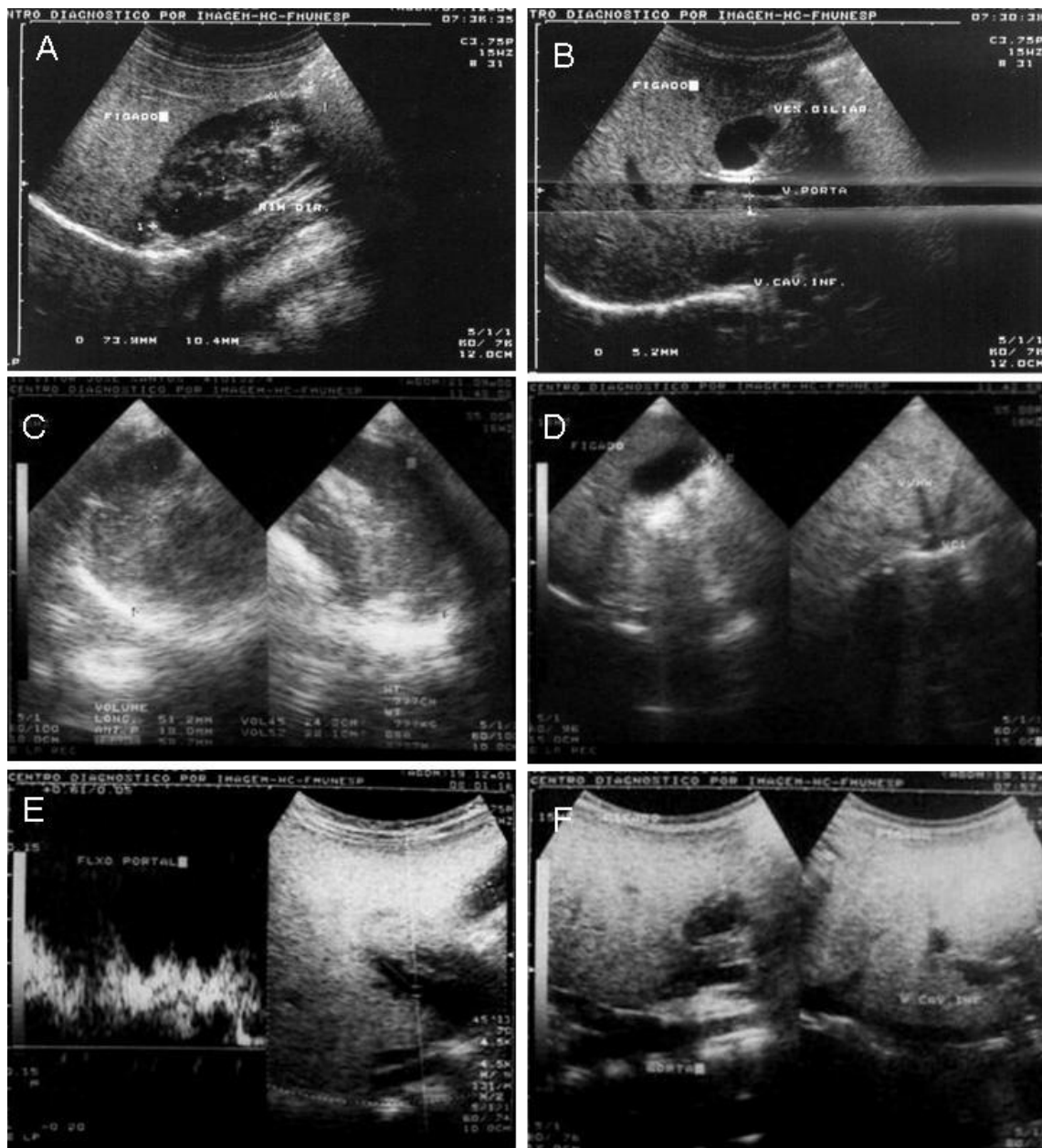
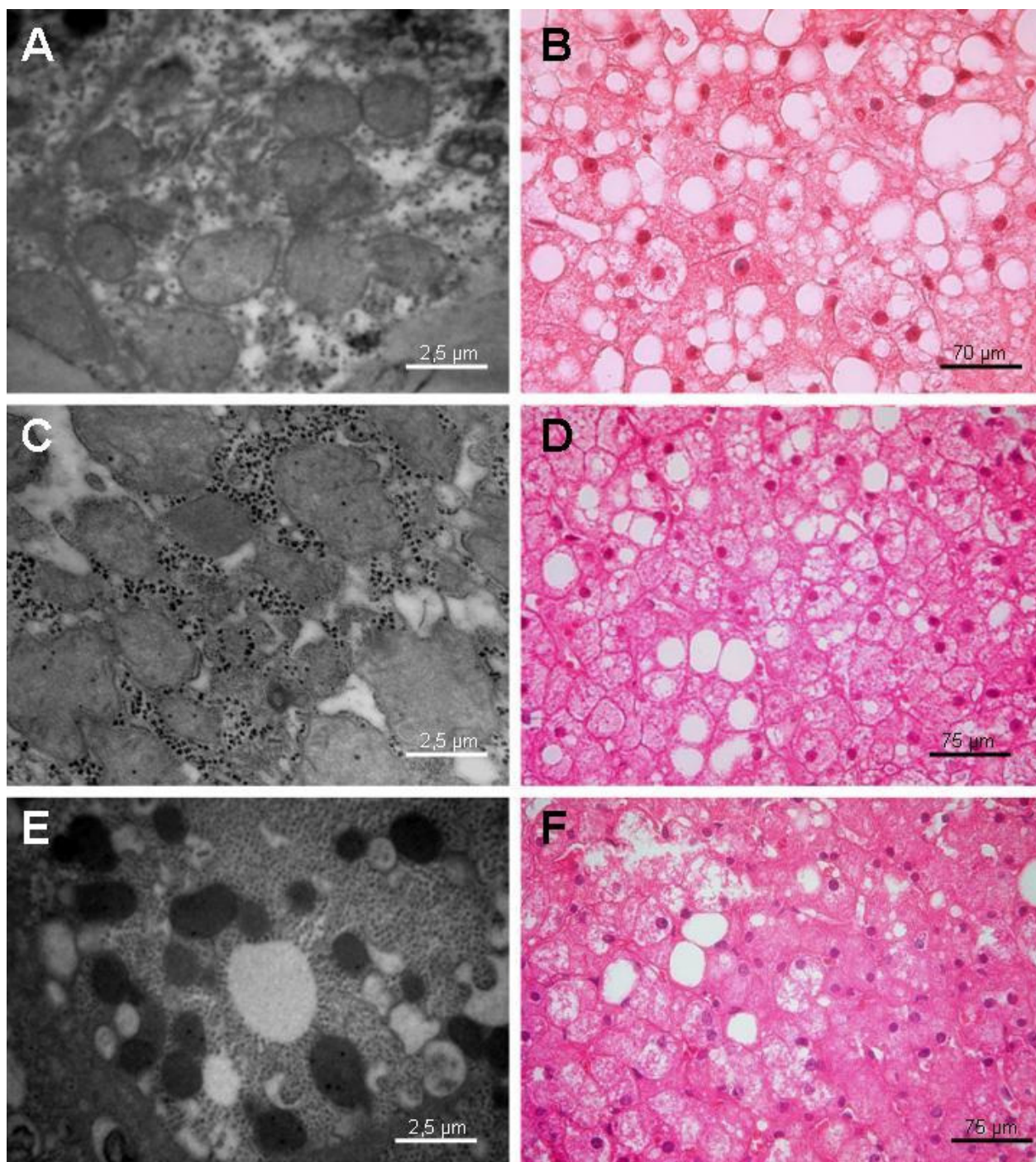


Figura 12 - Ultrassonografia realizada nos anos de 2000, 2001 e 2004. A e B, em 2000: diagnóstico de hepatomegalia associada com aumento difuso de ecogenecidade do parênquima hepático. C e D, em 2001: diagnóstico de hepatomegalia homogênea. E e F, em 2004, diagnóstico de esteatose hepática leve.

Figura 13 -Micrografias de microscopia de luz e eletrônica de transmissão nas diferentes biópsias. A e B: biópsia obtida em 2000. C e D: biópsia obtida em 2001. E e F: biópsia obtida em 2004. B, D e F: Hematoxilina e Eosina.



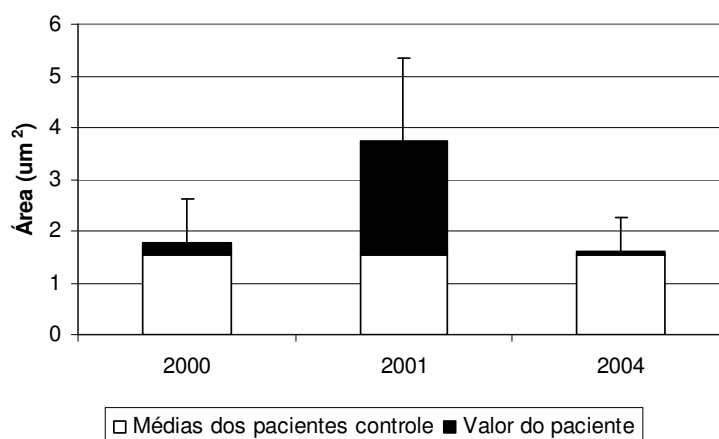


Figura 14 - Área mitocondrial média obtida para as três biópsias realizadas. Os valores são expressos em micrômetros quadrados (μm^2).

Tabela 05 - Valores das enzimas hepáticas, parâmetros bioquímicos e resultados da morfometria. ALT – Alanina aminotransferase; AST – Aspartato aminotransferase; GGT – Gama-glutamil transpeptidase.

Ano	2000	2001	2004	Valores de Referência
% Esteatose Microvesicular	48%	59%	42%	-
Intensidade de Esteatose Total	4	4	2	-
ALT (U/l)	25	26	48	< 40
AST (U/l)	25	22	47	< 37
GGT (U/l)	37	50	20	< 40
Fosfatase Alcalina (U/l)	460	206	215	< 719
Colesterol Total (mg/dl)	146	156	-	< 200
Triglicérides (mg/dl)	51	54	34	< 120
LDL (mg/dl)	77	-	-	< 130
HDL (mg/dl)	59	-	64	30 - 65
Proteína Total (g/dl)	6,8	6,9	7,4	6 – 8
Albumina (g/dl)	4,7	4,5	3,98	3,5 – 5,5
Glicose (mg/dl)	104	-	-	70 - 110
Peso (g)	9240	11165	18200	-
Altura (cm)	72.5	82.5	107	-

6. DISCUSSÃO

Poucos são os relatos existentes na literatura científica de trabalhos realizados com análise quantitativa de mitocôndrias hepáticas em mamíferos. Um dos trabalhos pioneiros sobre o tema foi o realizado por Bahr e colaboradores em 1966, onde foi proposta metodologia para a contagem de mitocôndrias. Em 1977, Zierold e Schäfer descrevem as dificuldades encontradas na realização de morfometria em mitocôndrias hepáticas de ratos. Koch e colaboradores, em 1978, realizaram amplo estudo estereológico e bioquímico das alterações hepáticas ultraestruturais relacionadas à colelitíase. Murray e colaboradores (1981) realizaram estudo das alterações ultraestruturais em ratos submetidos à hepatectomia parcial, com determinação de volume mitocondrial. Dubuisson e colaboradores (1982) relataram, a partir de estudo morfométrico, alteração conformacional e numérica em mitocôndrias na zona 3 em ratos com derivação portocaval. Lea & Hollenberg (1989) realizaram estudo em murinos, por meio de microscopia eletrônica de varredura, com dimensionamento de mitocôndrias de várias células, incluindo hepatócitos. Zhou (1990) verificou diminuição do volume, sem alteração da superfície de mitocôndria, em hepatócitos de indivíduos portadores de cirrose hepática. Sirotkin e colaboradores (1993) relataram alterações morfofuncionais em mitocôndrias, a partir de estudos morfológicos e bioquímicos em animais que sofreram irradiação experimental, verificando alterações numéricas e volumétricas. Lea e colaboradores (1994) verificaram diferenças morfológicas em mitocôndrias, em microscopia eletrônica de varredura de diferentes células, inclusive em hepatócitos, dimensionado principalmente as cristas tubulares. Yang & Makita (1998) realizaram análise ultraestrutural em hepatócitos de macacos submetidos a rápido estresse, determinando alteração na área mitocondrial. Mandel e colaboradores (2001) relataram os achados histológicos e ultraestruturais, a partir de análise semi-quantitativa, associados à Síndrome de Depressão do DNA mitocondrial. Sato (2004) realizou amplo estudo ultraestrutural e morfométrico em hepatócitos de ratos normais, incluindo as mitocôndrias. Le e colaboradores

(2004) relataram, com base em análise quantitativa, a distribuição zonal de megamitocôndrias com inclusões cristalinas na EHNA.

Neste sentido, merece destaque no presente estudo a composição de grupo controle com pacientes sem alterações hepáticas e pertencentes a grupo etário bastante específico: até um máximo de 14 anos, onde definimos a densidade e área mitocondrial médias (72 ± 7 mitocôndrias/corte sagital de hepatócito e $1,52 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$, respectivamente), procedimento bastante difícil. Num primeiro momento foi proposta obtenção de material hepático a partir de necrópsias de crianças com óbito de causa traumática (acidente), quando iniciada a coleta de material junto ao Serviço de Verificação de Óbito (SVO) e Instituto Médico-Legal (IML) do município de Campinas. No entanto, devido ao longo intervalo de tempo decorrido entre o momento do óbito e a coleta do fragmento, foram observadas marcadas alterações nas dimensões e características mitocondriais. Diante desta constatação, optou-se pelo levantamento de biópsias hepáticas do Departamento de Patologia da FCM/Unicamp, buscando selecionar pacientes pediátricos com diagnóstico de normalidade ou de fígado reacional à ML e que tivessem também material colhido adequadamente para a realização de MET. Como material com estas características se mostrou extremamente escasso, foi realizado contato com o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, onde também foi realizado levantamento dos registros dos pacientes, complementando-se o número de pacientes utilizados para compor o grupo controle, ou seja, $n=10$. Pérez-Carreras e colaboradores (2003) realizaram estudo sobre EHNA com grupo controle semelhante ao nosso, porém com indivíduos adultos e sem análise em microscopia eletrônica. Nosso grupo controle, sem dúvida, poderá ser utilizado como referência para a realização de muitos outros estudos de microscopia eletrônica em fígado de crianças.

Igualmente destacamos a composição da presente casuística, já que não encontramos na literatura nenhum relato de estudo morfométrico mitocondrial em tecido hepático de crianças relacionado à esteatose “pura”. Muitos autores descrevem alterações mitocondriais relacionadas à DGHNA (Caldwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001; Pessayre e Fromenty, 2005; Ibdah et al., 2005; Wei et al. 2008), porém o presente estudo é o primeiro que verifica as alterações numéricas e volumétricas das mitocôndrias, de forma quantitativa.

Diversos estudos foram ainda realizados para caracterizar a DGHNA em casuística mais abrangente (Schwimmer et al., 2003; Schwimmer et al., 2005; Kleiner et al., 2005; Mendler et al., 2005; Radetti et al., 2006; Ciba & Widhalm, 2007; Sagi et al., 2007), em modelos animais (Natarajan et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Zhang et al., 2007; Petrosillo et al., 2007; Oleszczuk, et al., 2007) ou relacionados à EHNA (Manton et al, 2000; Pérez-Carreras et al., 2003; Le et al., 2004) porém não há relatos na literatura com grupo de estudo tão restrito: crianças portadoras somente de esteatose, perfazendo pelo menos 25% da área tecidual amostrada, não obesas e sem qualquer outra doença associada. A justificativa para esta padronização se pautou justamente na necessidade de se buscar eventuais alterações mitocondriais que pudessem justificar a ocorrência de esteatose em grupo infantil com pouca ou nenhuma manifestação clínica e/ou laboratorial e que não se relacionasse a outras doenças.

Também houve dificuldade na composição deste grupo de estudo retrospectivo, onde vários casos precisaram ser dispensados por insuficientes informações clínicas e/ou laboratoriais nos prontuários ou ainda por inadequação na coleta e/ou fixação do material.

Com relação aos resultados obtidos, cabe uma discussão inicial sobre os achados na microscopia de luz. A realização das colorações especiais (reações histoquímicas) permitiu um delineamento mais preciso do grupo de estudo e controle, excluindo-se pacientes com outras doenças de base (Figura 07). O Tricrômio de Masson não evidenciou fibrose perissinusoidal e/ou

portal em nenhum dos pacientes, afastando-se esteatohepatite e outras hepatopatias crônicas. O PAS, com e sem diástase, não evidenciou qualquer tipo de depósito, o que poderia ser indicativo de possíveis doenças metabólicas como, por ex., deficiência de α 1-anti-tripsina. A coloração de Perls tampouco demonstrou outros depósitos, tais como ferro e bilirrubina.

Basicamente, a única alteração nestas amostras teciduais foi a esteatose mista, ou seja, macro e microvesicular. A esteatose hepatocelular é geralmente macrovesicular, porém pode ocasionalmente estar associada à microvesicular (Zafrani, 2004). Na casuística deste estudo observou-se a presença dos dois tipos de esteatose em todos os casos do grupo de estudo (18), sendo que 61% apresentaram predomínio de esteatose microvesicular. Schwimmer e colaboradores (2003), num estudo de DGHNA em 43 pacientes pediátricos, na sua maioria obesos, verificaram que 33% destes apresentavam somente esteatose do tipo macrovesicular, sendo que destes, 66% a apresentam de maneira grave. Esteatose mista é tipicamente observada em algumas espécies como nos humanos e ratos (Oleszczuk et al., 2007). Schwimmer e colaboradores (2005), num estudo com 100 pacientes portadores de doença hepática não-alcoólica verificaram que 16% apresentavam somente esteatose e, em média, havia equilíbrio entre a porcentagem de esteatose micro e macrovesicular, achados semelhantes aos deste trabalho. A esteatose microvesicular, independente da etiologia, é associada a pior prognóstico, inclusive com relatos de morte por insuficiência hepática ou suas complicações (Day e James, 1998a). A esteatose macrovesicular é considerada condição benigna (Sherlock, 1995), porém há dúvidas quanto à sua evolução desfavorável, associando-se ao desenvolvimento de necroinflamação, fibrose e cirrose (Bacon et al., 1994). Estudos recentes, em modelo animal, indicam que na esteatose macrovesicular, independentemente de ser causada por dieta deficiente em proteína ou por álcool, há o aumento da capacidade regenerativa dos hepatócitos quando comparada à esteatose microvesicular (Oleszczuk et al., 2007). O padrão de esteatose, ou seja, o

percentual de um tipo de esteatose em relação ao outro, pode se alterar de acordo com a condição clínica do paciente, ou ainda de acordo com alterações metabólicas dos hepatócitos, como observado nas Amostras 12, 13 e 14, que representam biópsias sequenciais do mesmo paciente (Figura 14 e Tabela 05). Neste caso foi verificado predomínio de esteatose microvesicular associada ao aumento das dimensões mitocondriais, porém esta relação será discutida mais adiante. Fica também evidente a ausência de relação entre intensidade da esteatose total e predomínio de um tipo específico conforme observado na tabela 03. Apesar de não se encontrar relatos na literatura sobre este dado, o predomínio de um tipo de esteatose sobre o outro, independe do percentual de tecido afetado pela esteatose total.

Em relação à composição do grupo controle para análise em MET, obtivemos os seguintes valores de área mitocondrial média e número médio de mitocôndrias/hepatócito: $1,52 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$ e 72 ± 7 mitocôndrias/ hepatócito (referente a um plano de corte medial), respectivamente. Em humanos (adultos), Phillips e colaboradores (1987) descreveram dimensões mitocondriais de 0,4 a 0,6 μm por 0,7 a 1,0 μm (região periportal) e 0,5 a 0,6 μm por 0,6 a 0,8 μm (região centrolobular) e um número total de mitocôndrias por hepatócito de 2200. Murray e colaboradores (1981) determinaram o volume mitocondrial em ratos de $0,57 \pm 0,07 \mu\text{m}^3$ e um número total de mitocôndrias por hepatócito de 2640 ± 250 . Yang & Makita (1998) determinaram, em macacos, área mitocondrial média de $1.944 \pm 0,141 \mu\text{m}^2$ e número de mitocôndrias por hepatócitos de $13.440 \pm 1,016$. Os valores da densidade mitocondrial obtidas neste estudo são de difícil comparação com os dados da literatura, uma vez que são expressos em número total de mitocôndrias por célula. Já o valor descrito por Yang & Makita (1998) para o número de mitocôndrias por hepatócito se mostrou excessivamente elevado em análise proporcional aos demais.

De maneira geral, houve dificuldade em comparar os resultados obtidos neste estudo com os demais autores, tanto pelas diferenças de ordem de grandeza, como pela diferença nos modelos de estudos (experimentais em animais, em sua maioria). Além disso, não foram encontrados relatos de estudos semelhantes realizados em crianças. O valor obtido para a área mitocondrial média (que indiretamente é um indicativo de volume), foi o que apresentou maiores dificuldades em ser comparado aos relatos da literatura. Os valores relatados por Yang & Makita (1998), apesar de obtidos em mitocôndrias de hepatócitos de primatas, estão mais próximos dos valores obtidos no presente estudo.

Frente ao exposto, é importante destacar que a padronização destes valores (densidade e área mitocondrial média) foi de fundamental importância dentro do modelo experimental escolhido para o trabalho, uma vez que estes serviram como parâmetros de comparação com os valores obtidos para o grupo de estudo.

Relativo ao grupo de estudo, foi observada elevação significativa da área mitocondrial média, que se mostrou bastante pronunciada nos pacientes que apresentavam predominância de esteatose microvesicular. Em contrapartida, pacientes com predomínio de esteatose macrovesicular apresentaram mitocôndrias com valores de área considerados normais. Tais resultados podem corroborar com os relatos de Sherlock e Dooley (2002) em que a esteatose microvesicular apresenta maior importância clínica, podendo evoluir de forma desfavorável, uma vez que as alterações mitocondriais podem implicar em alterações celulares mais graves. Esteatose microvesicular ocorre como resultado da estagnação da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e está associada a dano hepatocelular, podendo levar a insuficiência hepática, coma e morte nas formas mais graves (Fromenty et al., 1997). Concordamos, portanto, com as observações de Sherlock e Dooley (2002), em que esta mereça maior importância clínica, podendo implicar em alterações celulares mais graves, com consequente evolução desfavorável.

Há grande número de publicações relacionando a esteatose (principalmente a microvesicular) a alterações mitocondriais. Podemos citar Sokol e Treem (1999), que relataram que na insuficiência hepática neonatal, a esteatose está relacionada a aumento da densidade, com ocasional aumento do tamanho mitocondrial, Mandel et al. (2001) observaram, na esteatose microvesicular, alterações mitocondriais na matriz, cristas e também aumento no número total de mitocôndrias e Bioulac-Sage et al. (1993) relataram proliferação mitocondrial (alteração “oncocítica”) em pacientes portadores de esteatose microvesicular. A associação de disfunção mitocondrial com esteatose microvesicular também pode ser observada em modelos experimentais, como na ingestão de ácido orótico (Miyazawa et al., 1982), baixa metionina, dieta com deficiência de colina, indução de fígado gorduroso com tetraciclina (Fréneaux et al., 1988) e na toxicidade por drogas como aspirina, ibuprofeno e pirofeno (Geneve et al., 1987; Keller et al., 1992; Deschamps et al., 1994).

O caso em que foram realizadas três biópsias consecutivas evidencia claramente a relação da esteatose microvesicular com o aumento da dimensão mitocondrial. A análise morfológica das biópsias realizadas demonstrou esteatose total em todos os momentos, que variou de grau 4 (> 75%) em 2000 e 2001 a 2 (25-50%) em 2004; a porcentagem de esteatose microvesicular foi de 48, 59 e 42%, respectivamente. Em todas as biópsias foi observado aumento da área mitocondrial média (que, obviamente, reflete seu volume). No entanto, na biópsia de 2001 o aumento foi muito mais evidente, correspondendo à maior porcentagem de esteatose microvesicular (59%), a despeito da esteatose total. Esta, por exemplo, foi idêntica à observada em biópsia anterior, ou seja, grau 4 em ambas, porém em 2000 a porcentagem da esteatose microvesicular foi menor (48%).

Outro indicativo de comprometimento mitocondrial é a observação frequente de megamitocôndrias, muitas vezes apresentando inclusões cristalinas. Estes achados são relatados

na Doença de Wilson (Sternlieb, 1968), na NASH e, mais recentemente, na EHNA, relacionada indiretamente ao estresse oxidativo (Caldwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001, Le et al., 2004). A presença de megamitocôndrias, no entanto, pode representar um processo adaptativo devido ao estresse oxidativo, ao invés de lesão secundária (Le et al., 2004). Na EHNA e em pacientes alcoolistas, com aumento do metabolismo ou oxidação de lipídios, observa-se aumento da expressão dos níveis de β -hidroxibutirato e atividade da enzima β -hidroxibutirato-desidrogenase, sugerindo que as mitocôndrias estejam submetidas a alteração adaptativa (Kiessling e Pilstrom, 1971; Sanyal et al., 2001). As inclusões cristalinas têm sido descritas em diversas outras condições. Foram encontradas estruturas cristalinas similares na *Escherichia coli* sob condições de estresse oxidativo. Wolf e colaboradores (1999) demonstraram que estas estruturas são formadas pela co-polimerização de compostos semelhantes à ferritina e DNA bacteriano. Foi hipotetizado que a configuração cristalina represente uma medida de proteção ao DNA bacteriano. Devido à origem evolucionária da mitocôndria de procariontes simbióticos e do importante papel dos metabólitos do ferro no estresse oxidativo, é interessante a especulação de que as megamitocôndrias na EHNA/DGHNA devam apresentar semelhante função, em meio à alteração metabólica existente na esteatose (Le et al., 2004).

Apesar do evidente aumento do tamanho das mitocôndrias nos pacientes que apresentaram esteatose microvesicular, alterações na densidade mitocondrial não ficaram claramente expressas. É possível que realmente não ocorra alteração na densidade mitocondrial neste grupo específico de pacientes, porém é necessário apontar a existência de uma fragilidade na determinação deste parâmetro: devido à existência de vacúolos de gordura dentro dos hepatócitos, supõe-se que ocorra uma alteração na distribuição normal das mitocôndrias no citosol, gerando alta variação no resultado (evidenciado na figura 11 pelo elevado erro padrão),

principalmente quando comparamos os resultados dos pacientes com esteatose aos pacientes do grupo controle (em que não há vacúolos de lípidos na célula).

Na nossa casuística, 64% dos pacientes com esteatose microvesicular e 57% dos pacientes com esteatose macrovesicular, apresentaram aumento no nível sérico de pelo menos uma aminotransferase hepática. Alguns autores como Rachid & Roberts (2000) e Molleston et al. (2002), relatam elevações maiores de AST em relação à ALT, porém esta relação é bem característica na hepatite alcoólica, em que a relação AST/ALT é superior a 1 (Zafrani ES, 2004). Na nossa casuística, somente 39% dos pacientes portadores de esteatose (de ambos os tipos) apresentaram elevação das aminotransferases hepáticas com razão AST/ALT maior que 1. Elevações nos níveis destas enzimas parecem não apresentar relação direta com um dos tipos de esteatose e, conseqüentemente, também não apresentam relação com o aumento do volume mitocondrial, haja vista a ampla variação dos valores enzimáticos, tanto para os pacientes com esteatose microvesicular como para os pacientes com esteatose macrovesicular.

Manton e colaboradores (2000) verificaram, em pacientes obesos portadores de EHNA, que todos apresentaram alterações nas aminotransferases, sem ocorrer alteração na fosfatase alcalina. Estes resultados, quando comparados com os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que as elevações das aminotransferases se relacionam aos estágios mais avançados da DGHNA, principalmente na obesidade, condições ausentes na presente casuística. No entanto, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, não foi observado por Manton e colaboradores, relação evidente da elevação das aminotransferases com predomínio de um dos tipos de esteatose. De acordo com Harrison e Bisceglie (2003), muitos pacientes com NAFLD são assintomáticos, mostrando ligeira alteração dos níveis séricos das aminotransferases (raramente superior a três vezes do valor limite). Relação AST/ALT inferior a 1 é útil no diagnóstico diferencial com outras doenças hepáticas (Zanin et al., 2002). Schwimmer e

colaboradores (2003) verificam, em casuística pediátrica, ausência de elevações significativas das aminotransferases hepáticas em pacientes somente com esteatose, elevações significativas de ALT em pacientes com inflamação portal, e de AST e ALT na fibrose (perissinusoidal e portal). Nobile e colaboradores (2006) também verificaram aumento mais significativo de ALT e AST na fibrose do que na esteatose, sendo que a relação AST/ALT em ambos os casos foi inferior a 1. Elevações plasmáticas de ALT geralmente são consideradas como medida de lesão hepatocelular, o que justifica seu aumento na inflamação (Schwimmer et al., 2003). Schwimmer e colaboradores (2005) relataram também, em casuística pediátrica com predomínio de obesos, elevação nas aminotransferases, porém, nos pacientes que apresentavam somente esteatose, a elevação foi mais discreta. Tendo em vista que a presente casuística foi composta apenas por pacientes com esteatose, era mesmo de se esperar que os valores das aminotransferases não apresentassem valores muito elevados. Controversamente, Oleszczuk e colaboradores (2007) verificaram elevações significativas de ALT e GGT na esteatose macrovesicular e de AST na esteatose microvesicular, porém estes resultados devem ser analisados com cuidado por se tratar de modelo experimental em porcos com esteatose induzida por álcool e por dieta deficiente em proteínas.

A mitocôndria é o local de ocorrência de diversos processos metabólicos, tais como o ciclo do ácido tricarboxílico, β -oxidação de ácidos graxos, síntese de uréia e outros, utilizando-se de combustíveis como glicose e ácidos graxos para obtenção de ATP. Assim, qualquer distúrbio num destes mecanismos, pode causar graves danos à célula e, conseqüentemente, ao tecido. Defeitos na cadeia respiratória não são raros, sendo causa conhecida de insuficiência hepática precoce na infância (Morris, 1999), levando a alteração na oxidação de ácidos graxos (Sokol & Treem, 1999). Por sua vez, alterações na β -oxidação mitocondrial podem resultar no acúmulo de

ácidos graxos no citosol, representado tipicamente pela esteatose microvesicular (Natarajan et al., 2006; Fromenty & Pessayre, 1995).

Em indivíduos obesos e com resistência à insulina as lesões hepáticas são causadas por aumento da β -oxidação mitocondrial (devido à elevada quantidade de ácidos graxos disponibilizados ao fígado) e estagnação da fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial (devido à liberação de $\text{TNF-}\alpha$ nestas condições). Este desequilíbrio entre o fornecimento de elétrons (pela β -oxidação) e sua utilização (pela cadeia respiratória) causa produção de espécies reativas de oxigênio, como os anions superóxido e peróxido de hidrogênio (Begrich et al., 2006). Estas EROs e outros produtos citotóxicos da peroxidação lipídica (que ocorre quando há disponibilidade de ácidos graxos livres) provocam estresse oxidativo com diminuição de ATP e NAD, danos em proteínas e DNA e diminuição de glutathione, fibrose devido à ativação de células hepáticas estreladas e inflamação devido ao aumento de citocinas inflamatórias e $\text{TNF-}\alpha$ (Browning e Horton, 2004), fazendo com que haja a progressão da esteatose à EHNA. Em indivíduos portadores de esteatose, principalmente microvesicular, há diminuição da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos, sendo que estes são canalizados para a β -oxidação nos peroxissomos e para ω -oxidação nos microssomos, havendo formação de EROs, que podem levar ao estresse oxidativo (Natarajan et al., 2006). O estresse oxidativo pode produzir dano de DNAm e, conseqüentemente, ocorrer transcrição errônea de complexos da cadeia respiratória, estagnando seu funcionamento, levando à produção adicional de EROs, retro-alimentando o ciclo.

Os resultados obtidos neste estudo permitem que os pacientes do grupo de estudo sejam caracterizados como portadores de hepatopatias mitocondriais primárias. Estas estão associadas à alteração no transporte de elétrons e na FOx, síndrome de depleção do DNAm e

defeitos na oxidação de ácidos graxos, todas situações relacionadas à associação de esteatose microvesicular e macrovesicular. As hepatopatias mitocondriais primárias, na maioria das vezes, se manifestam como doenças multissistêmicas, com envolvimento neuromuscular, acidose láctica e/ou rápida e desfavorável evolução, bem como os exames laboratoriais costumam ser muito alterados. No entanto, atividade reduzida dos complexos da cadeia respiratória e estagnação parcial da FOx têm sido descritas e associadas a doença hepática de gravidade variada e em diferentes idades, com predomínio em neonatos e crianças (Treem e Sokol, 1998). Para confirmação desta hipótese seria necessário a realização da avaliação de atividade enzimática, DNAMt e/ou indicadores de estresse oxidativo.

Acreditamos, portanto, que os pacientes que compõem nossa casuística sejam portadores de defeito primário em algum complexo da cadeia respiratória, ou de deficiência enzimática na β -oxidação mitocondrial. Nessas condições haveria acúmulo de lipídios na forma de esteatose, bem como se desenvolveria estresse oxidativo pelos mecanismos apresentados acima. O exame histológico do fígado com defeitos na cadeia respiratória pode mostrar quatro principais alterações: esteatose, fibrose, colestase e necrose. Esteatose está presente em quase todos os casos de doença hepática mitocondrial. Esteatose microvesicular é a alteração típica, mas muitas vezes está acompanhada pela esteatose macrovesicular (Morris, 1999). Como não observamos fibrose, colestase e/ou necrose em nenhum dos nossos casos, muito provavelmente, nossos pacientes sejam portadores de forma mais branda de hepatopatia mitocondrial.

Os mecanismos que induzem a “hipertrofia” mitocondrial permanecem ainda obscuros. A observação de que em hepatócitos com alta proliferação de mitocôndrias, estas apresentam tamanho e formato semelhantes, e frequentemente ausência de cristas visíveis, pode suportar a hipótese de hiperplasia compensatória destas organelas (Mandel et al, 2001). Nesta mesma perspectiva, nossos resultados sugerem que o aumento das dimensões mitocondriais e,

consequentemente, da membrana interna (e cristas), matriz mitocondrial e do espaço intermembranoso, ocorre como mecanismo compensatório dos processos metabólicos parcial ou completamente interrompidos, além de apresentar papel de proteção contra o estresse oxidativo. Um aspecto importante, tendo em vista a teoria dos “dois golpes”, proposto por Day e James (1998a) para explicar a patogênese da DGHNA, é que a esteatose propriamente não faz com que ocorra o desenvolvimento de doença hepática. No entanto, é um fator que pode sensibilizar o fígado para os efeitos mais danosos de um “segundo golpe”. Assim, um fator de estresse, que é inócuo em fígado saudável, pode levar ao desenvolvimento de EHNA em fígado esteatótico (Gentile e Pagliassotti, 2008). O acúmulo de gordura hepática em si não é prejudicial, mas sim, os insultos secundários (por exemplo, ROS e citocinas inflamatórias) impostos ao fígado esteatótico são necessários para a progressão da esteatohepatite. Mais recentemente, crescente número de trabalhos na literatura científica, sugere fortemente que a composição dos ácidos graxos presentes no fígado interfere na gravidade da lesão hepática, com piora da progressão relacionada aos ácidos graxos saturados (Gentile e Pagliassotti, 2008). Foi proposto também que o aumento da relação de ácidos graxos saturados para insaturados armazenados no fígado pode contribuir para a progressão de esteatose simples para EHNA. Portanto, dentro do contexto da hipótese dos “dois-golpes”, os ácidos graxos saturados podem representar um segundo golpe intrínseco, que acelere o desenvolvimento da EHNA (Gentile e Pagliassotti, 2008).

Como já relatado anteriormente, a DGHNA é caracterizada por amplo espectro de lesões patológicas, variando de esteatose à fibrose, podendo culminar com cirrose e mesmo se complicar com o aparecimento de carcinoma hepatocelular (Zafrani, 2004). Nesta perspectiva, a identificação precoce da forma mais grave de esteatose pode ter importância fundamental no prognóstico da doença. As alterações histológicas e a história natural da DGHNA provavelmente reflitam um processo complexo multifatorial em que o ambiente genético tem grande importância

(Valenti et al., 2002), uma vez que ainda não se compreende porque em alguns pacientes ocorre somente esteatose, enquanto que outros desenvolvem esteatohepatite, cirrose ou carcinoma hepatocelular. Resistência à insulina, metabolismo anormal dos ácidos graxos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, desregulação de citocinas e produção de diversos mediadores são os principais fatores de interação implicados na fisiopatologia da DGHNA (Zafrani, 2004). Um estudo recente demonstrou que 4 genes que contribuem para a sensibilidade diminuída à insulina foram super-expressos no fígado de pacientes com DGHNA, enquanto que 12 genes importantes para a manutenção da função mitocondrial foram sub-expressos (Sreekumar et al., 2003).

Os pacientes que compõem esta casuística são, portanto, muito provavelmente portadores de hepatopatia mitocondrial primária, por defeito primário em algum complexo da cadeia respiratória ou de deficiência enzimática na β -oxidação mitocondrial, sobretudo aqueles com esteatose microvesicular predominante. No entanto, para confirmação desta hipótese seria necessária a realização da avaliação da atividade enzimática, DNAm e/ou indicadores de estresse oxidativo.

Os resultados do presente estudo, evidenciando ausência de alterações mitocondriais nos casos com predomínio de esteatose macrovesicular, vão de acordo com a opinião de Oleszczuk (2007) e Sherlock (1995), em que a esteatose macrovesicular seja lesão de menor gravidade, quando comparada com a esteatose microvesicular. Estes autores sugerem que o fígado gorduroso às custas de esteatose macrovesicular seja mais resistente a eventuais outras agressões. Ao contrário, a esteatose microvesicular, que representa condição mais grave, com risco de morte por insuficiência hepática (Andrade et al., 1992; Ellis et al., 1996), parece tornar o fígado mais sensível para mecanismos deletérios secundários (Day e James, 1998a). Fígados que desenvolvem moderada e grave esteatose microvesicular após o transplante, mostram aumento

significativo na perda precoce de função (Fishbein et al., 2005), muito provavelmente devido à diminuição do número de hepatócitos em regeneração (Oleszczuk, 2007). A capacidade regenerativa reduzida na esteatose microvesicular contribui para o prognóstico mais negativo neste tipo de alteração hepática.

Portanto, é de grande importância a determinação do padrão predominante da esteatose hepática, tanto para o diagnóstico da lesão e suspeição da etiologia, como para previsão do prognóstico.

Como discutido anteriormente, a esteatose propriamente não faz com que ocorra o desenvolvimento de doença hepática, no entanto, é um fator que pode sensibilizar o fígado para os efeitos mais danosos de um "segundo golpe", principalmente com predomínio de esteatose microvesicular.

7. CONCLUSÕES

1. Em grupo pediátrico, a esteatose hepática de causa não determinada e não associada a nenhuma alteração morfológica, mostrou-se predominantemente microvesicular;
2. Na avaliação ultraestrutural mitocondrial, a determinação de valores de normalidade prévios, por meio de criação de grupo controle, é fundamental, pois os dados de literatura são escassos e conflitantes;
3. Em grupo pediátrico, a esteatose hepática microvesicular predominante demonstrou aumento das dimensões mitocondriais e não se relacionou as alterações numéricas das mitocôndrias;
4. Apesar de não haver inflamação e/ou fibrose, a esteatose microvesicular pode ter evolução desfavorável e, portanto, a denominação esteatose “pura” deve se restringir aos casos com predomínio de forma macrovesicular;
5. O aumento das dimensões mitocondriais observado nos pacientes com esteatose microvesicular predominante pode estar associado a formas brandas de hepatopatia mitocondrial primária (por diminuição da β -oxidação ou parcial estagnação da fosforilação oxidativa) podendo, portanto, ter evolução desfavorável, principalmente em face de um segundo “golpe”;
6. Alterações séricas das aminotransferases hepáticas e presença de esteatose macrovesicular não mostraram relação com alterações de densidade ou de volume nas mitocôndrias;
7. Nossos resultados representam contribuição significativa tanto para a melhor compreensão da esteatose pouco sintomática em grupo pediátrico, como pela caracterização de inédito grupo controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMALEK, M.F.; DIEHL, A. Mechanisms underlying nonalcoholic steatohepatitis. **Drug Discov Today Dis Mech**, 3: 479-88, 2006.
- AMARAPURKAR, D.N.; HASHIMOTO, E.; LESMANA, L.A.; SOLLANO, J.D.; CHEN, P.J.; GOH, K.L. How common is non-alcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region and are there local differences? **J Gastroenterol Hepatol**, 22: 788-93, 2007.
- ANDRADE, Z.A.; LESBORDES, J.L.; RAVISSE, P.; PARANÁ, R.; PRATA, A.; BARBERINO, J.S.; TREPO, C. Fulminant hepatitis with microvesicular steatosis (a histologic comparison of cases occurring in Brazil-Labrea hepatitis-and in central Africa-Bangui hepatitis). **Rev Soc Bras Med Trop**, 25(3):155-60, 1992.
- ANGULO, P.; KEACH, J.C.; BATTS, K.P.; LINDOR, K.D. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 30: 1356-62, 1999.
- BACON, B.R.; FARAHVASH, M.J.; JANNEY, C.G.; NEUSSCHWANDER-TETRI, B.A. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, 107: 1103-1109, 1994.
- BAHR, G.F.; HERBENER, G.H; GLAS, U. A method for the counting of mitochondria. **Exp Cell Res**, 41(1): 99-108, 1966.
- BAKKER, H.D.; SCHOLTE, H.R.; DINGEMANS, K.P.; SPELBRINK, J.N.; WIJBURG, F.A.; VAN DEN BOGERT, C. Depletion of mitochondrial deoxyribonucleic acid in a family with fatal neonatal liver disease. **J Pediatr**, 128, 683-687, 1996.
- BAYARD, M.; HOLT, J.; BOROUGHS, E. Nonalcoholic fatty liver disease. **Am Fam Physician**, 73(11): 1961-8, 2006.
- BEDOJNI, 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**, 42: 44-52, 2005.
- BEGRICHE, K.; IGOUDJIL, A.; PESSAYRE, FROMENTY, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. **Mitochondrion**, 6: 1-28, 2006.
- BELLENTANI, S.; TIRIBELLI, C.; SACCOCCIO, G.; SODDE, M.; FRATTI, N.; DE MARTIN, C.; *et al.* Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. **Hepatology**, 20(6): 1442-9, 1994.
- BERSON, A.; DE BECO, V.; LETTERON, P.; ROBIN, M.A.; MOREAU, C.; EL KAHWAJI, J.; *et al.* teatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, 114: 764-774, 1998.
- BIOULAC-SAGE, P.; PARROT-ROULAUD, F.; MAZAT, J.P.; LAMIREAU. T.; COQUET, M.; SANDLER, B.; *et al.* Fatal neonatal liver failure and mitochondrial cytopathy (oxidative phosphorylation deficiency): a light and electron microscopic study of the liver. **Hepatology**, 18: 839-46, 1993.

- BOGENHAGEN, D.F. Repair of mtDNA in vertebrates. **Am J Hum Genet**, 64: 1276-81, 1999.
- BRAND, B.; FERGUSON, S.; NUNNARI, J.; KÜNLBRANDT, W. **Conversão de Energia: Mitocôndrias e Cloroplastos**. In: A Célula. ALBERTS, B. (Org.). Trad: VEIGA, A.B.G. (Org). Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 769 – 830.
- BREMER, J. Carnitine: metabolism and functions. **Physiol Rev**, 63: 1420-80, 1983.
- BROWNING, D.J.; HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, 114: 147-52, 2004.
- BROWNING, J.D.; SZCZEPANIAK, L.S.; DOBBINS, R.; NUREMBERG, P.; HORTON, J.D.; COHEN, J.C.; *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, 40: 1387-1395, 2004.
- BRUNT, E.M.; JANNEY, C.G.; DI BISCEGLIE, A.M.; , Neuschwander-Terri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatites: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, 94: 2467-74, 1999.
- BUGIANESI, E.; LEONE, N.; VANNI, E.; MARCHESINI, G.; BRUNELLO, F.; CARUCCI, P.; *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, 123: 134–140, 2002.
- CALDWELL, S.H.; SWERDLOW, R.H.; KHAN, E.M.; IEZZONI, J.C.; HESPENHEIDE, E.E.; PARKS, J.K.; *et al.* Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, 31: 430–4, 1999.
- CHARLTON, M.; SREEKUMAR, R.; RASMUSSEN, D.; LINDOR, K.; NAIR, S. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 35: 898–904, 2002.
- CIBA, I.; WIDHALM, K. The association between non-alcoholic fatty liver liver disease and insulin resistance in 20 obese children and adolescents. **Acta Paediatrica**, 96: 109-12, 2006.
- CLARK, J.; DIEHL, A., Hepatic steatosis and type 2 diabetes mellitus. **Curr Diab Rep**, 2: 210-215, 2002.
- CLARK, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **J Clin Gastroenterol**, 40: S5-S10, 2006.
- CORMIER-DAIRE, V.; CHRETIEN, D.; RUSTIN, P.; ROTIG, A.; DUBUISSON, C.; JACQUEMIN, E.; HADCHOUEL, M.; BERNARD, O.; MUNNICH, A. Neonatal and delayed-onset liver involvement in disorders of oxidative phosphorylation. **J Pediatr**, 130: 817-22, 1997.
- CORTEZ-PINTO, H.; ZHI LIN, H.; QI YANG, S.; ODWIN DA COSTA, S.; DIEHL, A.M. Lipids up-regulate uncoupling protein 2 expression in rat hepatocytes. **Gastroenterology**, 116: 1184-93, 1999.

- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Adaptações, acúmulos intracelulares e envelhecimento celular**. In: Robbins – Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 27-43.
- CRESPO, J.; CAYON, A.; FERNANDEZ-GIL, P.; HERNANDEZ-GUERRA, M.; MAYORGA, M.; DOMINGUEZ-DIEZ, A.; *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. **Hepatology**, 34: 1158-63, 2001.
- DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, 114: 842-5, 1998a.
- DAY, C.P.; JAMES, O.F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**, 27: 1463-6, 1998b.
- DE VIVO, D.C. Reye syndrome: a metabolic response to an acute mitochondrial insult? **Neurology**, 28: 105-108, 1978.
- DEMEILLIERS, C.; MAISONNEUVE, C.; GRODET, A.; MANSOURI, A.; NGUYEN, R.; TINEL, M.; *et al.* Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. **Gastroenterology**, 123: 1278-90, 2002.
- DENTIN, R.; PEGORIER, J.P.; BENHAMED, F.; FOUFELLE, F.; FERRE, P.; FAUVEAU, V.; *et al.* Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. **J Biol Chem**, 279: 20314–26, 2004.
- DESCHAMPS, D.; DEBECO, V.; FISCH, C.; FROMENTY, B.; GUILLOUZO, A.; PESSAYRE, D. Inhibition by perhexiline of oxidative phosphorylation and the beta-oxidation of fatty acids: possible role in pseudoalcoholic liver lesions. **Hepatology**, 19(4): 948-61, 1994.
- DIENSTAG, J.L. The role of liver biopsy in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 36(5): S152-60, 2002.
- DUBUISSON, L.; BIOULAC, P.; SARIC, J.; BALABAUD, C. Hepatocyte ultrastructure in rats with portacaval shunt. A morphometric study of acinar zones. **Dig Dis Sci**, 27: 1003-10, 1982.
- ELLIS, A.J.; WENDON, J.A.; PORTMANN, B.; WILLIAMS, R. Acute liver damage and ecstasy ingestion. **Gut**, 38(3): 454-8, 1996.
- FESTI, D.; COLECCHIA, A.; SACCO, T.; BONDI, M.; RODA, E.; MARCHESINI, G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev**, 5: 27–42, 2004.
- FINCK, B.N.; KELLY, D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. **J Clin Invest**, 116: 615-22, 2006.
- FISHBEIN, M.; MOGREN, J.; COX, S.; JENNINGS, R. Undetected hepatomegaly in obese children by primary care physicians: a pitfall in the diagnosis of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Pediatrics**, 44: 135-41, 2005.
- FREITAS, L.A.R.; COTRIM, H.P. Esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Atlas histológico. Salvador: Nova Agência e Lab. Zambon, 2006. 75 págs.

- FRÉNEAUX, E., LABBE, G.; LETTERON, P.; THE LE DINH, DEGOTT, C.; GENÈVE, J.; *et al.* Inhibition of the mitochondrial oxidation of fatty acids by tetracycline in mice and in man: possible role in microvesicular steatosis induced by this antibiotic. **Hepatology**, 8(5):1056-62, 1998.
- FROMENTY, B.; PESSAYRE, D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. **Pharmacol Ther**, 67: 101-54, 1995.
- GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A.; MORALES, A. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. **Mol Pharmacol**, 48: 825-34, 1995.
- GENEVE, J.; HAYAT-BONAN, B.; LABBE, G.; DEGOTT, C.; LETTERON, P.; FRENEAUX, E.; *et al.* Inhibition of mitochondrial beta-oxidation of fatty acids by pirprofen. Role in microvesicular steatosis due to this nonsteroidal anti-inflammatory drug. **J Pharmacol Exp Ther**, 242(3): 1133-7, 1987.
- GENTILE, C.L.; PAGLIASSOTTI, M.J. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. **J Nutr Biochem**, 19(9): 567-76, 2008.
- GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 4^a ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997: 266-72.
- GORDEN, E.S. Non-esterified graxo acids in blood of obese and lean subjects. **Am J Clin Nutr**, 8: 740-7, 1960.
- HARRISON, S.A.; KADAKIA, S.; LANG, K.A.; SCHENKER, S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. **Am J Gastroenterol**, 97: 2714-24, 2002.
- HARRISON, S.A.; DI BISCEGLIE, A.M. Advances in the understanding and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Drugs**, 63: 2379-94, 2003.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Ann Rev Biochem**, 54: 1015-69, 1985.
- HENSLEY, K.; KOTAKE, Y.; SANG, H.; PYE, Q.N.; WALLIS, G.L.; KOLKER, L.M.; *et al.* Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. **Carcinogenesis**, 21: 983-9, 2000.
- HERZIG, S.; LONG, F.; JHALA, U.S.; HEDRICK, S.; QUINN, R.; BAUER, A.; *et al.* CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. **Nature**, 413: 179-83, 2001.
- HIGUCHI, M.; PROSKE, R.J.; YEH, E.T. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. **Oncogene**, 17: 2515-24, 1998.
- HUI, J.M.; HODGE, A.; FARRELL, G.C.; KENCH, J.G.; KRIKETOS, A.; GEORGE, J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? **Hepatology**, 40: 46-54, 2004.

- HUI, J.M.; KENCH, J.G.; CHITTURI, S.; SUD, A.; FARRELL, G.C.; BYTH, K.; *et al.* Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. **Hepatology**, 38: 420-7, 2003.
- HULTCRANTZ, R.; GABRIELSSON, N. Patients with persistent elevation of aminotransferases: investigation with ultrasonography, radionuclide imaging and liver biopsy. **J Intern Med**, 233: 7-12, 1993.
- IBDAH JA, PERLEGAS P, ZHAO Y, ANGDISSEN, J.; BORGERINK, H.; SHADOAN, M.K.; *et al.* Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. **Gastroenterology**, 128: 1381-90, 2005.
- IIZUKA, K.; BRUICK, R.K.; LIANG, G.; HORTON, J.D.; UYEDA, K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101: 7281-6, 2004.
- ITO, K.; KIYOSAWA, N.; KUMAGAI, K.; MANABE, S.; MATSUNUMA, N.; YAMOTO, T. Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocyte apoptosis in rat livers by morphological and microarray analysis. **Toxicology**, 219: 175-86, 2006.
- 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. **Clin Radiol**, 43: 26-31, 1991.
- KAMEI, Y.; OHIZUMI, H.; FUJITANI, Y.; NEMOTO, T.; TANAKA, T.; TAKAHASHI, N.; *et al.* PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: 12378-83, 2003.
- KELLER, B.J.; MARSMAN, D.S.; POPP, J.A.; *et al.* Several nongenotoxic carcinogens uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. **Biochim Biophys Acta**, 1102(2): 237-44, 1992.
- KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W.; *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 41(6): 1313-21, 2005.
- KOCH, M.M.; FREDDARA, U.; LORENZINI, I.; GIAMPIERI, M.P.; JEZEQUEL, A.M.; ORLANDI, F. A stereological and biochemical study of the human liver in uncomplicated cholelithiasis. **Digestion**, 18:162-77, 1978.
- 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**, 38: 413-9, 2003.
- LE, T.H.; CALDWELL, S.H.; REDICK, J.A.; SHEPPARD, B.L.; DAVIS, C.A.; ARSENEAU, K.O.; *et al.* The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 39: 1423-9, 2004.

- LEA, P.J.; HOLLENBERG, M.J. Mitochondrial structure revealed by high-resolution scanning electron microscopy. **Am J Anat**, 184:245-57, 1989.
- LEA, P.J.; TEMKIN, R.J.; FREEMAN, K.B.; MITCHELL, G.A.; ROBINSON, B.H. Variations in mitochondrial ultrastructure and dynamics observed by high resolution scanning electron microscopy (HRSEM). **Microsc Res Tech**, 27: 269-77, 1994.
- LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; ELMORE, S.P.; NISHIMURA, Y.; *et al.* The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, 1366: 177-96, 1998.
- LIEBER, C.S. CYP2E1: from ASH to NASH. **Hepatol Res**, 28, 1-11, 2004.
- LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab**, 1: 361-70, 2005.
- LIN, J.; PUIGSERVER, P.; DONOVAN, J.; TARR, P.; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. **J Biol Chem**, 277: 1645-8, 2002.
- LIN, J.; TARR, P.T.; YANG, R.; RHEE, J.; PUIGSERVER, P.; NEWGARD, C.B.; *et al.* PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. **J Biol Chem**, 278: 30843-8, 2003.
- LIN, J.; WU, P.H.; TARR, P.T.; LINDENBERG, K.S.; ST-PIERRE, J.; ZHANG, C.Y.; *et al.* Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. **Cell**, 119(1): 121-35, 2004.
- MAHLER, H.; PASI, A.; KRAMER, J.M.; SCHULTE, P.; SCOGING, A.C.; BAR, W.; *et al.* Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **N Engl J Med**, 336: 1142-8, 1997.
- MANDEL, H.; HARTMAN, C.; BERKOWITZ, D.; ELPELEG, O.N.; MANOV, I.; IANCU, T.C. The hepatic mitochondrial DNA depletion syndrome: ultrastructural changes in liver biopsies. **Hepatology**, 34: 776-84, 2001.
- MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, 83: 835-9, 1995.
- MANNAERTS, G.P.; VAN VELDHOFEN, P.P.; CASTEELS, M. Peroxisomal lipid degradation via beta and alpha-oxidation in mammals. **Cell Biochem Biophys** 32, 73-87, 2000.
- MANTON, N.D.; LIPSETT, J.; MOORE, D.J.; DAVIDSON, G.P.; BOURNE, A.J.; COUPER, R.T. Non-alcoholic steatohepatitis in children and adolescents. **Med J Aust**, 173(9): 476-9, 2000.
- MARCHESINI, G.; MARZOCCHI, R.; AGOSTINI, F.; BUGIANESI, E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. **Curr Opin Lipidol**, 16: 421-7, 2005.
- MARION, A.W.; BAKER, A.J.; DHAWAN, A. Fat liver disease in children. **Arch Dis Child**, 89: 648-52, 2004.

- MATSUSUE, K.; HALUZIK, M.; LAMBERT, G.; YIM, S.H.; GAVRILOVA, O.; WARD, J.M.; BREWER, B. *et al.* Liver specific disruption of PPAR-g in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **J Clin Invest**, 111: 737-47, 2003.
- 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**, 116: 1413-9, 1999.
- MAZZIOTTA, M.R.; RICCI, E.; BERTINI, E.; VICI, C.D.; SERVIDEI, S.; BURLINA A.B.; *et al.* Fatal infantile liver failure associated with mitochondrial DNA depletion. **J Pediatr**, 21: 96-901, 1992.
- MCKENZIE, R.; FRIED, M.W.; SALLIE, R.; CONJEEVARAM, H.; DI BISCEGLIE, A.M.; PARK, Y.; *et al.* Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. **N Engl J Med**, 333: 1099-105, 1995.
- MENDLER, M.H.; KANEL, G.; GOVINDARAJAN, S. Proposal for a histological scoring and grading system for non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Int**, 25(3): 682-3, 2005.
- MIYAZAWA, S.; FURUTA, S.; HASHIMOTO, T. Reduction of beta-oxidation capacity of rat liver mitochondria by feeding orotic acid. **Biochim Biophys Acta** 11: 711(3): 494-502, 1982.
- MOLLESTON, J.P.; WHITE, F.; TECKMANN, J.; FITZGERALD, J.F. Obese children with steatohepatitis can develop cirrhosis in childhood. **Am J Gastroenterol**, 97: 2460-2, 2002.
- MORAES, C.T.; SHANSKE, S.; TRITSCHLER, H.J.; APRILLE, J.R.; ANDREETTA, F.; BONILLA, E.; *et al.* MtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. **Am J Hum Genet**, 48: 492-501, 1991.
- MORAN, J.R.; GHISHAN, F.K.; HALTER, S.A.; GREENE, H.L. Steatohepatitis in obese children: a cause of chronic liver dysfunction. **Am J Gastroenterol**, 78: 374-7, 1983.
- MORRIS, A.A. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. **Liver**, 19: 357-68, 1999.
- MORRIS, A.A.; TAANMAN, J.W.; BLAKE, J.; COOPER, J.M.; LAKE, B.D.; MALONE, M.; *et al.* Liver failure associated with mitochondrial DNA depletion. **J Hepatol**, 28: 556-63, 1998.
- MURRAY, A.B.; STRECKER, W.; SILZ, S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. **J Cell Sci**, 50: 433-48, 1981.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; DE MICHELI, F.; CASSADER, M.; RIZZETTO, M.; DURAZZO, M.; *et al.* Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 37: 909-16, 2003.
- NATARAJAN, S.K.; EAPEN, C.E.; PULLIMOOD, A.B.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Oxidative stress experimental liver microvesicular steatosis: role of mitochondria and peroxisomes. **Hepatology**, 21: 1240-9, 2006.

- NEUSCHWANDER-TETRI, B.; CALDWELL, S. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. **Hepatology**, 75: 1202-19, 2003.
- NOBILI, V.; MARCELLINI, M.; DEVITO, R.; CIAMPALINI, P.; PIEMONTE, F.; COMPARCOLA, D.; *et al.* NAFLD in children: a prospective clinical-pathological study and effect of lifestyle advice. **Hepatology**, 44: 458-65, 2006.
- NOMURA, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J.; KAJIYAMA, W.; TANI, S.; GOTO, M. Prevalence of fatty liver in a general population of Okinawa, Japan. **Jpn J Med**, 27: 142-149, 1998.
- OLESZCZUK, A.; SPANNBAUER, M.; TANNAPFEL, A.; BLÜHER, M.; HENGSTLER, J.; PIETSCH, U.C.; *et al.* Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. **Exp Toxicol Pathol**, 59: 205-13, 2007.
- OLIVEIRA, C.P.; COELHO, A.M.; BARBEIRO, H.V.; LIMA, V.M.; SORIANO, F.; RIBEIRO, C.; *et al.* Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. **Braz J Med Biol Res**, 39(2): 189-94, 2006.
- PARK, S.H.; JEON, W.K.; KIM, S.H.; KIM, H.J.; PARK, D.I.; CHO, Y.K.; *et al.* Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. **J Gastroenterol Hepatol**, 21: 138-143, 2006.
- PEREZ-CARRERAS, M.; DEL HOYO, P.; MARTIN, M.A.; RUBIO, J.C.; MARTIN, A.; CASTELLANO, G. *et al.* Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 38: 999-1007, 2003.
- PESSAYRE, D.; MANSOURI, A.; HAOUZI, D.; FROMENTY, B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. **Cell Biol Toxicol**, 15: 367-73, 1999.
- PETROSILLO, G.; PORTINCASA, P.; GRATTAGLIANO, I.; CASANOVA, G.; MATERA, M.; RUGGIERO, F.M.; *et al.* Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. **Biochim Biophys Acta**, 1767(10): 1260-7, 2007.
- PHILLIPS, M.J.; POUCELL, S.; PATTERSON, J.; VALENCIA, P. **The normal liver**. In: Liver: an atlas and text of ultrastructural pathology. New York: Raven Press, 1987. p. 1-35.
- RADETTI, G.; KLEON, W.; STUEFER, J.; PITTSCHIELER, K. Non-alcoholic fatty liver disease in obese children evaluated by magnetic resonance imaging. **Acta Paediatrica**, 95: 833-7, 2006.
- RASHID, M.; ROBERTS, E.A. Nonalcoholic steatohepatitis in children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 30: 48-53, 2000.
- RATZIU, V.; BONYHAY, L.; DI MARTINO, V.; CHARLOTTE, F.; CAVALLARO, L.; SAYEGH-TAINTURIER, M.H.; *et al.* Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. **Hepatology**, 35:1485-93, 2002.
- REID, A.E. Nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, 121: 710-23, 2001.

- ROTTENBERG, H. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat mitochondria by general anesthetics. **Proc Natl Acad Sci USA**, 80: 3313-7, 1983.
- SAADEH, S.; YOUNOSSI, Z.M.; REMER, E.M.; GRAMLICH, T.; ONG, J.P.; HURLEY, M.; *et al.* The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, 123:745-50, 2002.
- SAGI, R.; REIF, S.; NEUMAN, G.; WEBB, M.; PHILLIP, M.; SHALITIN, S. Nonalcoholic fatty liver disease in overweight children and adolescents. **Acta Paediatrica**, 96: 1209-13, 2007.
- SALWAY, J.G. (Ed.). **Metabolism at a Glance**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994, p. 28-78.
- SANCHEZ-ALCAZAR, J.A.; SCHNEIDER, E.; MARTINEZ, M.A.; CARMONA, P.; HERNANDEZ-MUNOZ, I.; SILES, E.; *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. **J Biol Chem**, 275: 13353-61, 2005.
- SANTAMARIA, E.; AVILA, M.A.; LATASA, M.U.; RUBIO, A.; MARTIN-DUCE, A.; LU, S.C.; *et al.* Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100: 3065-70, 2003.
- SANYAL, A.J.; CAMPBELL-SARGENT, C.; MIRSHAHI, F.; RIZZO, W.B.; CONTOS, M.J.; STERLING, R.K.; *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. **Gastroenterology**, 120: 1183-92, 2001.
- SANYAL, A.J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, 123: 1705-25, 2002.
- SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, 283: 1488-93, 1999.
- SATO, S. Ultrastructural and morphometric studies of normal rat hepatocytes. **J Submicrosc Cytol Pathol**, 36(2): 131-40, 2004.
- SCHON, E.A.; BONILLA, E.; DIMAURO, S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. **J Bioenerg Biomembr**, 29:131-49, 1997.
- SCHULZ, H. Beta-oxidation of fatty acids. **Biochim Biophys Acta**, 1081: 109-20, 1991.
- SCHWIMMER, J.B.; BEHLING, C.; NEWBURY, R.; DEUTSCH, R.; NIEVERGELT, C.; SCHORK, N.J.; *et al.* Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 42: 641-9, 2005.
- SCHWIMMER, J.B.; DEUTSCH, R.; RAUCH, J.B.; BEHLING, C.; NEWBURY, R.; LAVINE, J.E. Obesity, insulin resistance, and other clinicopathological correlates of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **J Pediatr**, 143(4): 500-5, 2003.

- SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Nutritional and Metabolic Liver Diseases**. In: SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. (eds.) *Diseases of the Liver and Biliary System*, 11th ed. Oxford: Blackwell Science, 2002: 423-52.
- SHERLOCK, S. Alcoholic liver disease. **Lancet**, 345: 227-9, 1995.
- SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M.; AMES, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91: 10771-8, 1994.
- SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J.D. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. **J Biol Chem**, 274(42): 30028-32, 1999.
- SIROTKIN, V.V.; GRISHIN, A.I.U.; SMIRNOV, V.A. Three-factor correlation analysis of morphofunctional changes in mitochondria based on the results of morphologic and biochemical studies. **Biull Eksp Biol Med**, 115: 303-5, 1993.
- SOBANIEC-LOTOWSKA, M.E.; LEBENSZTEJN, D.M. Ultrastructure of hepatocyte mitochondria in nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients: usefulness of electron microscopy in the diagnosis of the disease. **Am J Gastroenterol**, 98: 1664-5, 2003.
- SOKOL R.J.; DEVEREAUX, M.W.; O'BRIEN, K.; KWANDWALA, R.A.; LOEHR, J.P. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome c oxidase activity in rats with long-term copper overload. **Gastroenterology**, 105: 178-187, 1993.
- SOKOL, R.J.; TREEM, W.R. Mitochondria and childhood liver diseases. **J Pediat Gastroenterol Nut**, 28: 4-19, 1999.
- SORBI, D.; BOYNTON, J.; LINDOR, K.D. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. **Am J Gastroenterol**, 94: 1018-22, 1999.
- SREEKUMAR, R.; ROSADO, B.; RASMUSSEN, D.; CHARLTON, M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, 38:244-51, 2003.
- STERNLIEB, I.; Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease. **Gastroenterology**, 55: 354 -62, 1968.
- ST-PIERRE, J.; LIN, J.; KRAUSS, S.; TARR, P.T.; YANG, R.; NEWGARD, C.B.; *et al.* Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. **J Biol Chem**, 278: 26597-603, 2003.
- TAGHIBIGLOU, C.; CARPENTIER, A.; VAN IDERSTINE, S.C.; CHEN, B.; RUDY, D.; AITON, A.; *et al.* Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular apoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. **J Biol Chem**, 275: 8416-25, 2000.

- TERADA, H. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. **Biochim Biophys Acta** 639: 225-42, 1981.
- TOMIGANA, K.; KURAT, J.H.; CHEN, Y.K.; FUJIMOTO, E.; MIYAGAWA, S.; ABE, I. Prevalence of fatty liver in Japanese children and relationship to obesity. An epidemiological ultrasonographic survey. **Dig Dis Sci**, 40: 2002-9, 1995.
- TONSGARD, J.H.; GETZ, G.S. Effect of Reye's syndrome serum on isolated chinchilla liver mitochondria. **J Clin Invest**, 76: 816-25, 1985.
- TREEM, R.T.; SOKOL, R.J. Disorders of the mitochondria. **Semin Liver Disease**, 18: 237-53, 1998.
- VALENTI, L.; FRACANZANI, A.L.; DONGIOVANNI, P.; SANTORELLI, G.; BRANCHI, A.; TAIOLI, E.; *et al.* Tumor necrosis factor [alpha] promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, 122 :274-80, 2002.
- VALERIO, A.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; PISCONTI, A.; *et al.* TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **J Clin Invest**, 116: 2791-8, 2006.
- WALLACE, D. Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. **Trends Genet**, 5: 9-13, 1989.
- WEI, Y.; RECTOR, R.S.; THYFAULT, J.P.; IBDAH, J.A. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **World J Gastroenterol**, 14: 193-9, 2008
- WIECKOWSKA, A.; MCCULLOUGH, A.J.; FELDSTEIN, A.E. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. **Hepatology**, 46: 582-9. 2007.
- WOLF, S.G.; FRENKIEL, D.; ARAD, T.; FINKEL, S.E.; KOLTER, R.; MINSKY, A. DNA protection by stress-induced biocrystallization. **Nature**, 400: 83-5, 1999.
- WU, Z.; PUIGSERVER, P.; ANDERSSON, U.; ZHANG, C.; ADELMANT, G.; MOOTHA, V.; *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, 98: 115-24, 1999.
- YANG,S.Q.; LIN, H.Z.; MANDAL, A.K.; HUANG, J.; DIEHL, A.M. Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology. **Hepatology**, 34: 694-706, 2001.
- YANG, S.Q.; LIN, H.Z.; LANE, M.D.; CLEMENS, M.; DIEHL, A.M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 2557-62, 1997.
- YANG, Y.G.; MAKITA, T. Morphometry of fine structural alterations of hepatocytes of Japanese monkeys under fasting stress. **J Vet Med Sci**, 60: 849-52, 1998.

- YOON, J.C.; PUIGSERVER, P.; CHEN, G.; DONOVAN, J.; WU, Z.; RHEE, J.; *et al.* Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature**, 413: 131-8, 2001.
- ZAFRANI, E.S. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. **Virchows Arch**, 444: 3-12, 2004.
- ZAMIN, I. Jr.; MATTOS, A.A.; PERIN, C.; RAMOS, G.Z. The importance of AST / ALT rate in nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. **Arq Gastroenterol**, 39: 22-6, 2002.
- ZHANG, D.; LIU, Z.X.; CHOI, C.S.; TIAN, L.; KIBBEY, R.; DONG, J.; *et al.* Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci USA**, 104: 17075-80, 2007.
- ZHOU, X.J. Ultrastructural morphometry of liver parenchyma in hepatic cirrhosis. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, 19: 254-7, 1990.
- ZHOU YJ, LI YY, NIE YQ, MA JX, LU LG, SHI SL, CHEN MH, HU PJ. Prevalence of fatty liver disease and risk factors in the population of South China. **World J. Gastroenterol**, 13: 6419-24, 2007.

ANEXO I

Tabela 06 - Protocolo de processamento histológico dos fragmentos hepáticos para microscopia de luz.

Etapa	Substância / solução	Tempo (min)
Desidratação	Etanol 70 %	30
	Etanol 80 %	30
	Etanol 95 %	30
	Etanol Absoluto I	30
	Etanol Absoluto II	30
	Etanol Absoluto III	30
Diafanização	Etanol Abs. - Xilol PA 1:1	15
	Xilol PA I	30
	Xilol PA II	30
Embebição	Xilol PA – Parafina 1:1	30
	Parafina Histológica	150

Tabela 07 - Protocolo de preparação de lâminas histológicas.

Etapa	Substância / solução	Tempo (min)
Desparafinização	Xilol PA I	10
	Xilol PA II	10
Hidratação	Etanol Absoluto I	5
	Etanol Absoluto II	5
	Etanol 95 %	5
	Etanol 80 %	5
	Etanol 70 %	5
	Água destilada	5
Coloração	Conforme Quadro 03	
Desidratação	Etanol 95 %	5
	Etanol Absoluto I	5
	Etanol Absoluto II	5
	Etanol Absoluto III	5
Diafanização	Xilol PA I	5
	Xilol PA II	5

Quadro 03 - Protocolo de coloração das lâminas histológicas.

Coloração	Procedimento
Hematoxilina – Eosina	• Corar pela Hematoxilina de Harris por 5 minutos • Lavar em água por 10 minutos • Corar pela Eosina aquosa 2% por 2 minutos • Lavar em água rapidamente
Tricrômio de Masson	• Corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos • Lavar em água corrente por 10 minutos • Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos • Corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos • Passar por água destilada • Diferenciar pela solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos • Passar por água destilada • Corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos • Lavar em água destilada • Passar em água destilada
Impregnação pela prata (Método de Gomori)	• Oxidar em Permanganato de Potássio 0,5% por 5 minutos • Lavar em água corrente por 2 minutos • Diferenciar em Metabissulfito de Potássio 2% por 5 minutos • Lavar em água corrente por 2 minutos • Sensibilizar em Sulfato de Amônio Férrico 2% por 5 minutos • Lavar em água corrente por 5 minutos e passar em água destilada 3 vezes • Impregnar na solução de Prata Amoniacal (filtrando a solução sobre a lâmina) por 30 segundos despreze a solução utilizada • Lavar em água destilada rapidamente • Reduzir em Formol 20% por 3 minutos • Lavar em água corrente por 5 minutos • Passar em Cloreto de Ouro 0,2% por 10 minutos • Lavar em água destilada por 3 trocas • Passar em Metabissulfito de Potássio por 5 minutos • Lavar em água destilada 3 trocas • Passar em tiosulfato de Sódio 2% por 5 minutos • Lavar em água corrente por 2 minutos
PAS (Ácido Periódico de Schiff)	• Oxidar em Ácido Periódico 0,5% por 15 minutos • Lavar em água corrente por 5 minutos e enxaguar na água destilada por 3 vezes • Corar em Reativo de Schiff por 30 minutos • Lavar em água corrente por 5 minutos • Contra corar pela Hematoxilina de Harris por 5 segundos • Lavar em água corrente por 5 minutos
Coloração de Perls	• Passar em água destilada • Submeter a solução Clorídrico-Ferrocianeto por 1 hora • Enxaguar em água destilada por 3 vezes • Contracorar pela Safranina por 2 minutos • Passar em água para diferenciar (controle ao microscópio)

Tabela 08 - Protocolo de processamento histológico dos fragmentos hepáticos para microscopia de eletrônica de transmissão.

Etapa	Substância / solução	Tempo (min)
Desidratação	Acetona 30 %	15
	Acetona 50 %	15
	Acetona 70 %	15
	Acetona 90 %	15
	Acetona 100 % I	15
	Acetona 100 % II	15
	Acetona 100 % III	15
Embebição	Acetona - Resina 2:1	60
	Acetona - Resina 1:1	60
	Acetona - Resina 1:2	60
	Resina pura	24 h

BMI-for-age BOYS

Birth to 5 years (z-scores)

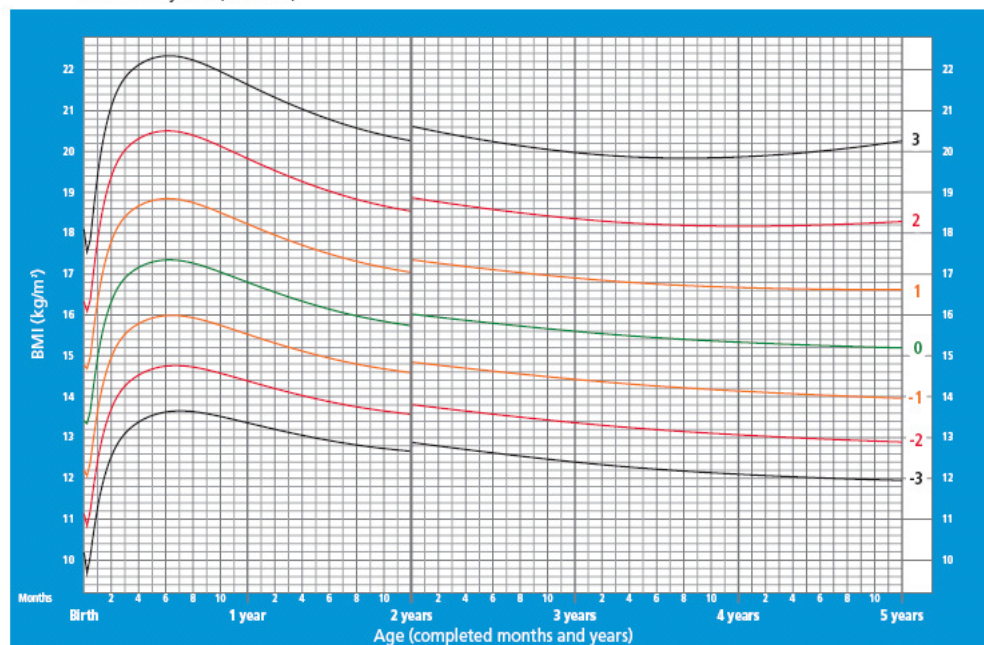


Figura 15: Índice de Massa Corpórea para indivíduos do sexo masculino (Fonte: www.who.int/childgrowth).

BMI-for-age GIRLS

Birth to 5 years (z-scores)

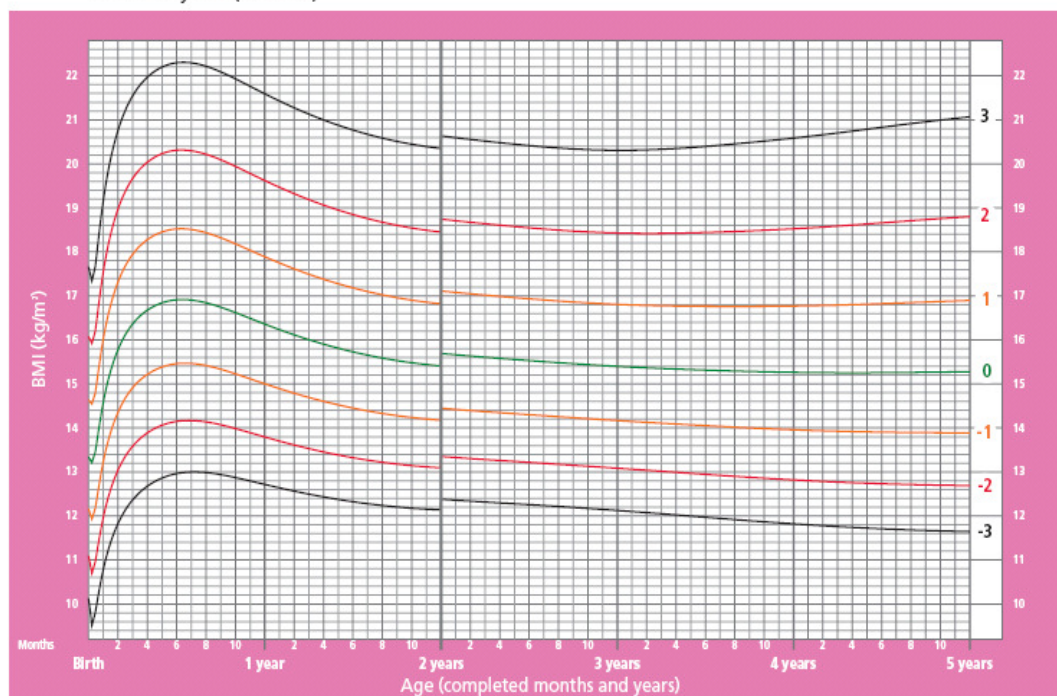


Figura 16: Índice de Massa Corpórea para indivíduos do sexo feminino (Fonte: www.who.int/childgrowth).