

Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Diheptanoína e Triheptanoína contra a Esteatose em Ratos

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do consumo crônico de di e triheptanoínas sobre a esteatose hepática (EH) em ratos. **Metodologia:** Ratos *Wistar* submetidos à dieta AIN-93 com 0%, 30% ou 50% de substituição do óleo por óleo rico em di- e triheptanoína, grupos TAGC₀, TAGC₃₀ e TAGC₅₀, respectivamente, por nove meses. O grupo-controle recebeu ração Labina®. Analisaram-se histologia e provas de função e lesão hepática, glicemia e perfil lipídico sérico. Realizaram-se análise de variância, teste F, teste de Dunnet e análises de regressão uni e multivariadas ($p < 0,05$). **Resultados:** TAGC₀, TAGC₃₀ e TAGC₅₀ desenvolveram EH; 80% de casos graves no TAGC₀ contra 40% no TAGC₅₀. Os pesos absoluto (PAF) e relativo do fígado (PRF) foram maiores em TAGC₀ e TAGC₃₀ e a glicemia foi maior em TAGC₃₀ e TAGC₅₀, que no grupo-controle. Colesterol total, LDL-c, LDL-c/HDL-c e proteínas totais foram maiores no grupo-controle. O óleo experimental reduziu o PRF e determinou tendência de redução do peso corporal, PAF, percentual de lipídios hepáticos e grau de EH (GHE). As variáveis explicativas para GHE foram peso final, glicemia, albumina, HDL-c, LDL-c, LDL-c/HDL-c, VLDL-c e fosfatase alcalina. **Conclusões:** Sugere-se que di e triheptanoínas exerçam efeito hepatoprotetor contra a EH, em ratos, em uma feição dose-dependente. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/7:1145-1155)

Descritores: Esteatose hepática; Diheptanoína; Triheptanoína

ABSTRACT

Hepatoprotective Effect of Diheptanoin and Tritreptanoin Chronic Consumption against Steatosis in Rats.

Objective: to evaluate the effect of chronic consumption of di- and triheptanoin on hepatic steatosis (HS) in rats. **Methodology:** Wistar rats were submitted to a diet AIN-93 with 0, 30 or 50% of its oil substituted with an oil rich in di- and triheptanoin, groups TAGC₀, TAGC₃₀ and TAGC₅₀ respectively, for nine months. The control group received Labina®. Liver histology, hepatic lesion and function proofs, glycemia and lipid profile, were performed. Variance analyses, F-test, Dunnet's test and uni- and multivariate regression analyses were performed ($p < 0.05$). **Results:** TAGC₀, TAGC₃₀ and TAGC₅₀ developed HS; 80% of severe cases in TAGC₀, as against 40% in TAGC₅₀. The absolute (ALW) and relative (RLW) liver weights were higher in TAGC₀ and TAGC₃₀, and glycemia was greater in TAGC₃₀ and TAGC₅₀, than in the Control. Total cholesterol, LDL-c, LDL-c/HDL-c and total proteins were higher in the Control. The experimental oil reduced RLW and showed a tendency in the reduction of body weight, ALW, percentage of hepatic lipids and the severity of HS. The explanatory variables in relation to HS were final weight, glycemia, albumin, HDL-c, LDL-c, LDL-c/HDL-c, VLDL-c and alkaline phosphatase. **Conclusions:** It is suggested that di- and triheptanoin have a hepatoprotector effect against HS, in rats, in a dose-dependant manner. (Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/7:1145-1155)

Keywords: Hepatic steatosis; Diheptanoin; Triheptanoin

original

MARIA A. FIRMINO DA SILVA
TEREZINHA DA R. ATAIDE
SUZANA L. DE OLIVEIRA
ANTONIO E. G. SANT'ANA
CYRO R. CABRAL JÚNIOR
MARIA DO C. L. V. BALWANI
FERNANDA G. S. DE OLIVEIRA
MÉRCIA C. SANTOS

Faculdade de Nutrição da
Universidade Federal de
Alagoas (MAFS, TRA, SLO,
CRCJ); Instituto de Química e
Biotecnologia da Ufal (AES);
Patologia do Hospital
Universitário Professor Alberto
Antunes (HUPAA)/Ufal (MCLVB),
Maceio, AL, Brazil.

Recebido em 14/12/2007

Aceito em 12/8/2008

INTRODUÇÃO

No atual contexto de transição nutricional, a esteatose hepática (EH) desperta grande interesse por sua forte ligação com a obesidade, as dislipidemias e o diabetes melito tipo 2, sendo considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica cujo principal componente é a resistência à insulina (1-6).

A EH consiste do acúmulo de lipídios histologicamente visível no citoplasma dos hepatócitos, que atinge 5% a 40% do peso do órgão (7). É a alteração metabólica hepática mais freqüente e resulta do desequilíbrio entre a síntese de triacilgliceróis (TAG), a partir de ácidos graxos, e a baixa secreção destes pelo hepatócito na forma de lipoproteínas. Inicialmente, os TAG acumulam-se nos hepatócitos por uma ou várias das seguintes vias: aumento do aporte de ácidos graxos livres circulantes, diminuição da β -oxidação e/ou diminuição da síntese ou da secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que é a principal responsável pela secreção de TAG pelo fígado (8).

Apesar de ter sido considerada há muito tempo condição benigna, a EH pode progredir para esteato-hepatite (EHNA) e formas mais graves e terminais de doenças hepáticas, como cirrose (9) e carcinoma hepatocelular. Sabe-se que, atualmente, 15% a 40% dos casos de EH podem evoluir para EHNA e esta pode progredir para cirrose, em 20% dos casos. Acredita-se que muitos pacientes com cirrose criptogênica, em filas de transplante, tenham sido portadores de EHNA não diagnosticada e tratada (10); entretanto, nesses casos, a confirmação da etiologia pode estar comprometida, em virtude da possível ausência de alterações histológicas comuns à EH.

Embora a prevalência verdadeira seja desconhecida (11,12), sabe-se que a EH atinge adultos e crianças (13) e está emergindo como a condição hepática mais comum no mundo ocidental (12,14). Estimativas sugerem que 20% a 30% dos adultos em países ocidentais possa ter EH (15) e até 75% dos pacientes com diabetes melito e obesidade (16).

Embora ainda não exista tratamento farmacológico eficaz para o tratamento da EH, todos os pacientes são encorajados a reduzir a ingestão de gorduras e praticar exercícios físicos regulares, com o objetivo de aumentar o gasto energético diário. Estratégias de intervenção nutricional e controle dos fatores de risco metabólicos associados devem ser avaliadas, visando a melhor prognóstico. No que se refere ao aspecto nutricional, as pesquisas têm buscado estabelecer relações entre a ma-

nipulação dietética de nutrientes, especialmente de carboidratos e lipídios, e a EH, objeto de preocupação nos quadros de resistência à insulina (11,12,14).

Os lipídios normalmente considerados são os TAG de cadeia longa (TCL), amplamente distribuídos na natureza. Uma outra categoria de lipídios, os TAG de cadeia média (TCM), tem sido empregada em situações clínicas especiais, em virtude de sua rápida digestão, liberando ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no intestino delgado. Os AGCM são mais polares e hidrofílicos que os de cadeia longa (AGCL); logo, sua absorção pelas células epiteliais do intestino é mais rápida (17).

Ao contrário dos AGCL, os AGCM não são significativamente incorporados aos quilomícrons; antes, são transportados pela porta-hepática, ligados à albumina, para o fígado. Além disso, apresentam oxidação acelerada durante o repouso e o exercício e prescindem do sistema carnitina palmitoil-transferase para a entrada na matriz mitocondrial, constituindo rápida fonte de energia para o organismo (17).

A trieptanoína, ou trienantina, um TCM constituído por três moléculas do ácido graxo enântico (heptanóico; 7:0), tem, recentemente, recebido atenção especial. Por apresentar característica incomum à maioria dos TCM, ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbonos, foi testada no tratamento dietoterápico das desordens metabólicas da oxidação de AGCL e na deficiência da enzima piruvato carboxilase (18,19). No entanto, são escassos os dados na literatura sobre os efeitos do consumo crônico da trieptanoína e dos produtos de sua digestão em estudos experimentais que possam assegurar o consumo humano por tempo indeterminado. Os relatos disponíveis estão restritos ao estudo toxicológico em ratos (20).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as repercussões hepáticas e alterações metabólicas associadas, do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína, em ratos com EH.

MÉTODOS

Óleo experimental

Uma mistura de ésteres de glicerol com ácido heptanóico foi obtida por síntese química, na ausência de catalisadores. Glicerol (VETEC, Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) e ácido heptanóico (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), em excesso

molar de 30%, foram misturados e mantidos à pressão reduzida, a 130 °C, sob agitação, por 100 horas. O produto reacional, identificado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, era composto por 64% de trieptanoína, 34% de dieptanoína e 2% de monoeptanoína. Para discussão neste trabalho, foi denominado óleo experimental. Os acilgliceróis foram analisados por meio de cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard (Agilent; Palo Alto, CA, EUA), modelo 5890, série II, equipado com coluna HP-I ou HP-5 e detector de ionização de chama. O hidrogênio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 60 °C, com acréscimos subsequentes de 10 °C.min⁻¹, até temperatura final de 275 °C; a temperatura do injetor foi mantida em 250 °C. A espectrometria de massas foi determinada a 70 eV em aparelho Finnigan (San Jose, CA, EUA), modelo TSQ 70, acoplado ao cromatógrafo gasoso. Adicionalmente, a dieptanoína e a trieptanoína, óleos transparentes, foram identificadas por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF; com pastilha de NaCl, em um espectrômetro FTIR 1600 Perkin-Elmer) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C (com solução de CDCl₃ solution, 15 mg mL⁻¹ CDCl₃, em um aparelho Bruker a 300 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C). Os dados espectroscópicos foram compatíveis com a estrutura da trieptanoína. A partir dos dados de RMN de ¹H e ¹³C, a estrutura proposta para o diacilglicerol obtido foi 1,3-dieptanoína. Para detalhes acerca da caracterização, consultar Ataíde e cols. (20). O óleo experimental foi armazenado sob refrigeração, protegido da luz, até a elaboração das dietas experimentais.

Animais e dietas experimentais

Ratos *Wistar* machos, recém-desmamados (22 a 26 dias de nascidos), pesando 47,22 g ± 11,79 [m ± DP], provenientes do biotério do Centro Universitário de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS)/Centro de Estudos Superiores de Maceió (Cesmac)/Fundação Educacional Jayme de Altavila (Fejal), foram divididos em três grupos (n = 10), identificados de acordo com a dieta oferecida: TAGC₀ (dieta AIN-93, do *American Institute of Nutrition*) (21), TAGC₃₀ e TAGC₅₀ (dieta AIN-93, com 30% e 50% de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental, respectivamente), por nove meses (Tabela 1). Até os dois meses de idade, os animais receberam a versão G (*growth*) da dieta AIN-93; a partir daí até o final do experimento, a ver-

são M (*maintenance*). As dietas isocalóricas apresentavam proporções equivalentes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais.

Foram utilizados, ainda, sete ratos machos da mesma linhagem e origem dos demais, aos dez meses de idade, para a obtenção de padrões de referência para análises bioquímicas e histológicas; estes animais, constituíram o grupo-controle adicional, denominado grupo-controle, alimentado com a ração comercial para roedores Labina®. Sua composição, segundo as informações do fabricante (Purina®), é de, aproximadamente, 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibras e 12% de minerais.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais no biotério de pesquisa (Biotério Setorial) da Faculdade de Nutrição/Ufal, com temperatura ambiente (20 a 24 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas, recebendo água e dieta *ad libitum*. Foram distribuídos nas gaiolas por ordem crescente de peso inicial, a fim de evitar diferenças significativas de peso entre os grupos. A evolução ponderal e a ingestão dietética de cada animal foram controladas semanalmente.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Ufal tendo sido aprovado sob nº 001316/2002-30, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS/Brasil), com base em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal, Unesco, 15.10.1978) e nacionais (Lei nº 6.638, de 08.05.1979).

Para efeito de avaliação das condições higiênico-sanitárias do biotério de pesquisa e monitoração dos animais, foram realizados exames parasitológicos de fezes a cada dois meses de estudo, por meio do método HPJ de Hoffman e cols. (22).

Ao final do período de nove meses de exposição às dietas controle e experimental, os animais foram mantidos em jejum noturno (12 horas), anestesiados por inalação de éter etílico e submetidos à coleta de sangue do plexo vascular retro-orbital, com auxílio de tubo capilar para micro-hematócrito. Os animais do grupo-controle foram levados do biotério de origem ao biotério de pesquisa um dia antes do sacrifício, para serem igualmente submetidos ao jejum noturno.

Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado a 3.500 rpm, por 10 minutos. O soro obtido foi transportado a 10 °C e processado no mesmo dia no Laboratório Central Dr. Aristeu Lopes (Lacen), em Maceió, AL. As análises foram realizadas em aparelho

Tabela 1. Composição das dietas TAGC70, TAGC730 e TAGC750 fundamentadas nas dietas AIN-93 G (G) para o crescimento e AIN-93 M (M) para a idade adulta dos animais (21).

Ingredientes (g/kg)	Dietas					
	TAGC,0		TAGC, 30		TAGC, 50	
	G	M	G	M	G	M
Caseína	200	140	200	140	200	140
Amido de milho Maizena®	497,5	565,7	497,5	565,7	497,5	565,7
Amido dextrinizado	132	155	132	155	132	155
Óleo de soja LIZA	70	40	49	28	35	20
Óleo experimental	-	-	21	12	35	20
Celulose microcristalina	50	50	50	50	50	50
Mistura mineral AIN-93 G	35	-	35	-	35	-
Mistura mineral AIN-93 M	-	35	-	35	-	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10	10	10
L-cistina	3,0	1,8	3,0	1,8	3,0	1,8
Bitartrato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
t-butil hidroquinona	0,014	0,008	0,014	0,008	0,014	0,008
Ácido graxo ω-6 adicionado ^a	-	-	3,60	0,84	6,00	4,08
Ácido graxo ω-3 adicionado ^a	-	-	0,60	0,14	1,00	0,68

^a Quantidade adicionada de ácidos graxos das séries; ω-6; e ω-3 às dietas experimentais.

TARGA 3000, Biotechnica Instruments S. p. A. (Wiener Lab., Rosário, Argentina), por meio de kits (Synermed International Inc. Westfield, IN, EUA).

Foram determinadas as concentrações séricas de: AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), fosfatase alcalina (FA), GGT (gama glutamil transferase), albumina, proteínas totais, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol HDL (HDL-c, *high density lipoprotein cholesterol*), colesterol VLDL (VLDL-c, *very low density lipoprotein cholesterol*), colesterol LDL (LDL-c, *low density lipoprotein cholesterol*) e glicose, para avaliação do efeito do óleo das dietas sobre a função hepática e o perfil lipídico dos animais. As determinações de VLDL-c e de LDL-c foram estimadas pelas fórmulas de Friedewald e cols. (23): VLDL-c = triacilgliceróis ÷ 5; LDL-c = colesterol total - colesterol HDL-c - triacilgliceróis ÷ 5.

Sacrifício dos animais e coleta do tecido hepático

Após o período experimental, os animais foram sedados e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, procedeu-se à abertura completa da cavidade abdominal e à retirada do fígado. O órgão foi pesado e o lobo maior, lobo esquerdo, seccionado no seu maior diâmetro; o fragmento obtido foi imerso em solução de formol a 10%, para fixação. A porção remanescente foi pesada, congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer a -20 °C.

Análise histológica do fígado

Os fragmentos do fígado, fixados em formol a 10%, foram clivados transversalmente e levados ao Centro de Patologia de Maceió (Cepama), para o processamento, inclusão em parafina e coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE). As análises histológicas ao microscópio óptico foram realizadas no setor de Patologia do Hospital Universitário da Ufal.

A EH foi classificada em cinco graus de acordo com as características histológicas apresentadas (Figura 1).

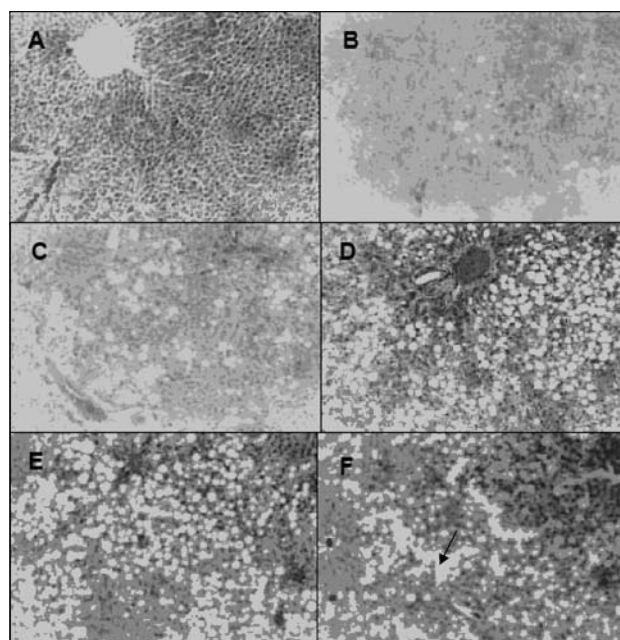


Figura 1. Cortes histológicos do tecido hepático corados pelo método HE. Esteatose grau 0 - ausência (A); grau 1 - leve (B); grau 2 - levemente moderado (C); grau 3 - moderado (D); grau 4 - grave (E); e grau 5 - grave com presença de pseudocistos (seta) (F), observada nos animais dos grupos-controle, TAGC70, TAGC730 e TAGC750.

Determinação do teor de lipídios totais do fígado e das dietas

A extração e a determinação dos lipídios totais do fígado e das dietas foram realizadas pelo método de Bligh e Dyer (24), em amostras congeladas. A adição de água destilada para a extração dos lipídios hepáticos foi reduzida de 8 mL para 2 mL em função da umidade da amostra, estimada em 50%. As análises foram realizadas em duplicata e os extratos obtidos, armazenados sob atmosfera de nitrogênio, em *freezer*.

Análise estatística

Após verificação dos pressupostos de normalidade (teste de Lilliefors; $p < 0,05$) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Durbin-Watson; $p < 0,05$), foram realizadas análise de variância, teste F, teste de Dunnett e análises de regressão uni e multivariadas, mantendo-se o nível de significância de até 5% de probabilidade de erro experimental. A significância dos coeficientes de regressão associados às variáveis explicativas nos modelos uni e multivariados foi determinada por meio do teste t, com até 10% de probabilidade de erro experimental. As variáveis foram excluídas do referido modelo pelo procedimento Backward.

RESULTADOS

A análise histológica do tecido hepático revelou diferentes graus de esteatose macrovesicular nos animais dos grupos TAGC_{7,0}, TAGC_{7,30} e TAGC_{7,50} (Tabela 2). Os animais do grupo TAGC_{7,0} apresentaram o dobro (80%) do número de casos graves, graus 4 e 5, quando comparados ao grupo TAGC_{7,50} (40%). Os animais do grupo-controle não apresentaram EH (Tabela 2).

O percentual de lipídios hepáticos revelou níveis muito elevados nos animais com EH, grupos TAGC_{7,0}, TAGC_{7,30} e TAGC_{7,50}, em relação ao grupo-controle ($p < 0,01$). O peso absoluto do fígado dos animais dos grupos TAGC_{7,0} e TAGC_{7,30} foi significativamente maior que o do grupo-controle ($p = 0,025$ e $0,048$, respectivamente). No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos-controle e TAGC_{7,50}, aquele submetido a maior substituição do óleo de soja pelo óleo experimental. O peso relativo do órgão, peso do fígado/peso corporal, seguiu a mesma tendência, ou seja, foi significativamente maior nos grupos TAGC_{7,0} e TAGC_{7,30}, do que no grupo-controle ($p = 0,015$ e $0,016$, respectivamente), e não diferiu entre os

animais-controle e TAGC_{7,50}. O peso corporal final, em todos os grupos de substituição, não diferiu do grupo-controle (Tabela 2).

Quanto às variáveis bioquímicas, foram observados níveis glicêmicos significativamente maiores nos animais dos grupos TAGC_{7,30} ($p = 0,032$) e TAGC_{7,50} ($p = 0,004$), em relação ao grupo-controle (Tabela 3). As proteínas totais, por sua vez, foram significativamente maiores no grupo-controle, em relação aos demais ($p < 0,001$). De maneira similar, os níveis séricos de colesterol total, de LDL-c e a relação LDL-c/HDL-c foram maiores no grupo-controle ($p \leq 0,01$). Os níveis de HDL-c não diferiram; entretanto, os animais TAGC_{7,0} apresentaram tendência de níveis inferiores àqueles do grupo-controle ($p = 0,052$).

Os níveis de AST também não diferiram entre o grupo-controle e aqueles submetidos aos diferentes níveis de substituição do óleo da dieta; entretanto, também foi observada tendência de níveis mais elevados nos animais do grupo TAGC_{7,0}, em relação àqueles do grupo-controle ($p = 0,051$). As demais variáveis relacionadas a função ou lesão hepática, albumina, ALT, relação AST/ALT, GGT e FA não diferiram significativamente entre o grupo-controle e os demais (Tabela 3).

Algumas variáveis apresentaram correlação linear positiva com a EH, como peso final ($r = 0,6$; $p < 0,001$), glicemia ($r = 0,42$; $p = 0,01$), peso absoluto do fígado ($r = 0,7$; $p < 0,001$), peso relativo do fígado ($r = 0,69$; $p < 0,001$), percentual de lipídios hepáticos ($r = 0,845$; $p < 0,001$), FA ($r = 0,43$; $p < 0,01$), ALT ($r = 0,34$; $p = 0,03$) e AST ($r = 0,37$; $p = 0,02$).

Os níveis séricos de proteínas totais apresentaram correlação linear negativa significativa com os graus de EH ($r = -0,580$; $p < 0,001$) e com outras variáveis intimamente relacionadas ao acúmulo hepático de TAG, como fígado total ($r = -0,49$; $p = 0,003$), fígado relativo ($r = -0,53$; $p = 0,001$) e percentual de lipídios hepáticos ($r = -0,54$; $p = 0,001$).

Algumas variáveis, que apresentaram correlação linear simples de Pearson com a esteatose, quando avaliadas pela regressão linear univariada, revelaram tendência de decréscimo ($p \geq 0,05$), à medida que o óleo experimental foi adicionado à dieta: GHE, peso final, peso absoluto do fígado e lipídios hepáticos (Figuras 2A, 2B, 2C e 2D, respectivamente). O peso relativo do fígado decresceu ($p = 0,039$) e a glicemia elevou-se ($p < 0,001$) com a adição do óleo experimental (Figuras 2E e 2F respectivamente).

Tabela 2. Valores médios para grau de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), percentual de lipídios hepáticos (%LH), pesos absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos-controle, TAGC70, TAGC730 e TAGC750.

Grupos	Variáveis				
	GEH	PCF (g)	LH (%)	PAF (g)	PRF
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Controle	0 ^a	400,11 ± 74,14 ^a	4,31 ± 1,02 ^a	11,67 ± 3,40 ^a	0,028 ± 0,006 ^a
TAGC _{7,0}	3,6 ± 1,17 ^b	508,82 ± 107,28 ^a	21,60 ± 9,10 ^b	19,06 ± 7,06 ^b	0,037 ± 0,006 ^b
TAGC _{7,30}	3,6 ± 1,43 ^b	481,16 ± 82,51 ^a	21,52 ± 8,75 ^b	18,29 ± 5,28 ^b	0,037 ± 0,005 ^b
TAGC _{7,50}	2,9 ± 1,66 ^b	487,44 ± 98,16 ^a	17,12 ± 8,9 ^b	16,01 ± 4,79 ^a	0,031 ± 0,003 ^a

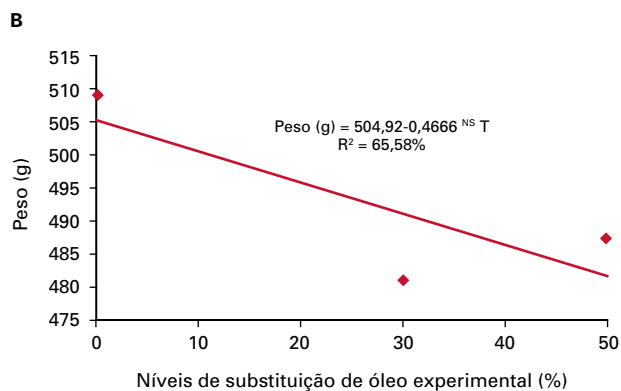
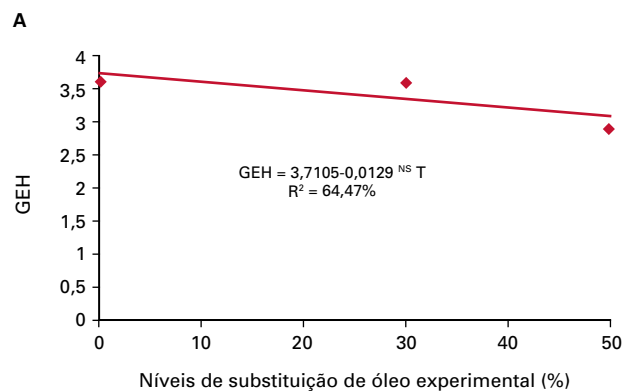
Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (p ≥ 0,05) pelo teste de Dunnett.

Tabela 3. Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos TAGC70, TAGC730, TAGC750 e grupo-controle.

Variáveis bioquímicas	Grupos			
	Controle	TAGC _{7,0}	TAGC _{7,30}	TAGC _{7,50}
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Glicemia (mg/dL)	94,33 ± 8,70 ^a	110,50 ± 4,71 ^a	115,04 ± 4,67 ^b	121,43 ± 3,83 ^b
Colesterol total (mg/dL)	197,73 ± 13,58 ^a	124,95 ± 8,36 ^b	123,68 ± 12,21 ^b	128,91 ± 9,12 ^b
Triglicerídeos (mg/dL)	116,37 ± 9,50 ^a	97,45 ± 6,83 ^a	102,07 ± 14,64 ^a	104,94 ± 7,83 ^a
LDL-c (mg/dL)	162,27 ± 10,60 ^a	84,41 ± 7,16 ^b	79,74 ± 7,37 ^b	85,34 ± 6,87 ^b
HDL-c (mg/dL)	31,39 ± 3,24 ^a	21,05 ± 1,74 ^a	23,52 ± 3,58 ^a	22,58 ± 2,58 ^a
LDL-c/HDL-c	5,94 ± 0,88 ^a	4,02 ± 0,20 ^b	3,70 ± 0,34 ^b	3,88 ± 0,20 ^b
VLDL-c (mg/dL)	23,27 ± 1,90 ^a	19,48 ± 1,37 ^a	18,18 ± 2,12 ^a	20,99 ± 1,56 ^a
Proteínas totais (g/dL)	9,87 ± 0,96 ^a	6,88 ± 0,09 ^b	6,97 ± 0,11 ^b	6,94 ± 0,14 ^b
Albumina (g/dL)	3,83 ± 0,51 ^a	4,23 ± 0,17 ^a	4,14 ± 0,08 ^a	4,08 ± 0,04 ^a
ALT (U/L)	103,14 ± 7,75 ^a	150,14 ± 24,86 ^a	143,06 ± 16,07 ^a	122,45 ± 16,06 ^a
AST (U/L)	169,28 ± 16,79 ^a	237,8 ± 24,74 ^a	224,65 ± 15,33 ^a	189,70 ± 14,88 ^a
AST/ALT	1,63 ± 0,21 ^a	1,68 ± 0,34 ^a	1,62 ± 0,27 ^a	1,62 ± 0,24 ^a
FA (U/L)	112,11 ± 19,30 ^a	310,14 ± 102,72 ^a	350,84 ± 89,85 ^a	263,65 ± 92,47 ^a
GGT (U/L)	38,87 ± 5,23 ^a	43,50 ± 7,56 ^a	51,32 ± 6,58 ^a	48,77 ± 5,62 ^a

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente (p ≥ 0,05) pelo teste de Dunnett.

copyright® ABE&M todos os direitos reservados



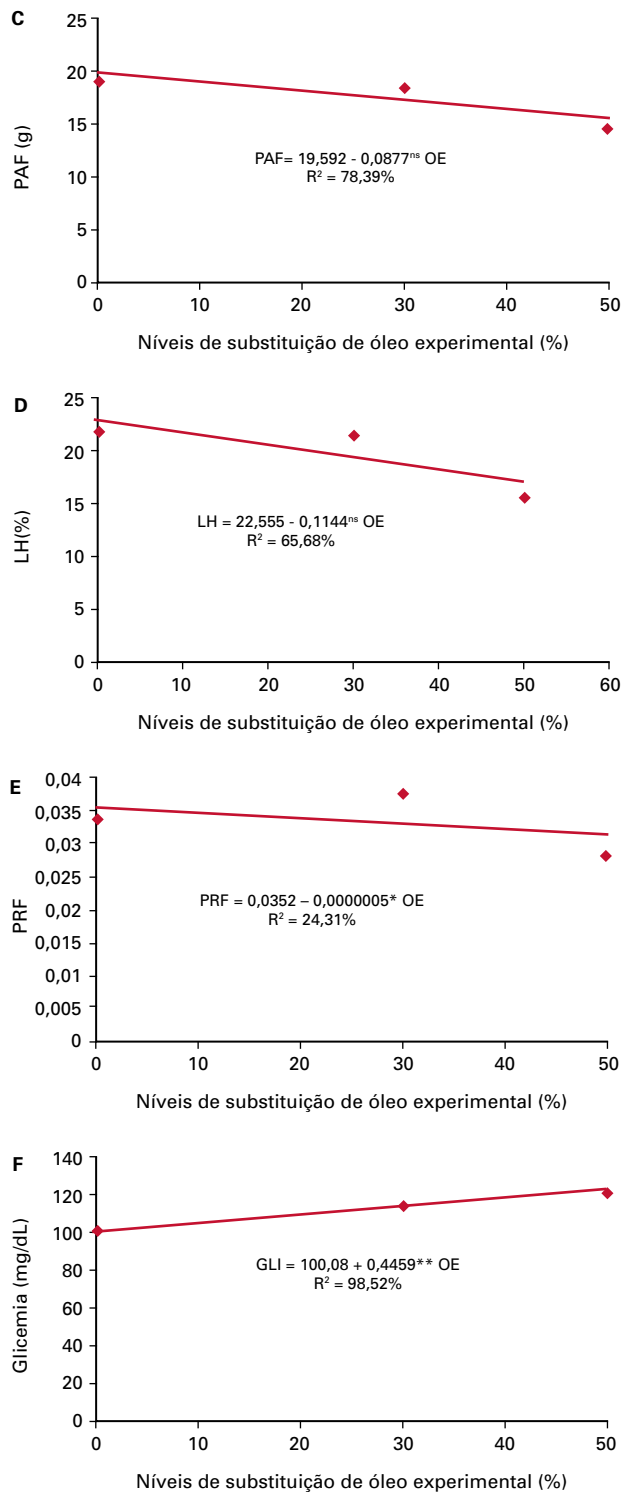


Figura 2. Análises de regressão linear simples e coeficientes de determinação (R²) para as variáveis graus de esteatose hepática (GEH) (A); peso final (peso) (B); peso absoluto do fígado (PAF) (C); lipídios hepáticos (LH) (D); peso relativo do fígado (PRF) (E); e glicemia (F).

Na Figura 2A, em relação aos níveis de substituição do óleo experimental nas dietas (0%, 30% e 50%), evidenciou-se que a cada 1% de adição houve decréscimo de 0,012 no GEH, com grau de ajuste do modelo regressivo univariado de 65,58%, ou seja, valores estimados iguais a 0,00, 0,36 e 0,60 para 0%, 30% e 50% de substituição, respectivamente. A mesma situação foi observada em relação ao peso final dos animais, que foi reduzido em 0,46 g para cada 1% de adição do óleo experimental, correspondendo ao total de 14 g de redução para TAGC₃₀ e 23,3 g para TAGC₅₀. Outras variáveis intimamente relacionadas com a EH, para as quais foram estimadas médias por meio da equação de regressão linear univariada (Tabela 4), também apresentaram decréscimo dose-dependente da adição do óleo experimental; os melhores resultados, à exceção da glicemia, foram observados com 50% de substituição.

Tabela 4. Médias estimadas para os grupos TAGC70, TAGC730, TAGC750 pela equação de regressão linear univariada para grau de esteatose hepática (GEH), peso corporal, pesos absoluto (PAF) e relativo (PRF) do fígado, percentual de lipídios hepáticos (LH) e glicemia.

Variável	Médias estimadas		
	TAGC ₀	TAGC ₃₀	TAGC ₅₀
GEH	3,7	3,3	3,1
Peso (g)	504,9	490,9	481,6
PAF (g)	19,6	17,0	15,2
LH (%)	22,6	19,1	16,8
PRF	0,0352	0,0351	0,351
Glicemia (mg/dL)	100,1	113,5	122,4

Dessa forma, um modelo de regressão linear multivariado foi criado para explicar o relacionamento do conjunto de variáveis que influenciaram significativamente (teste t; p < 0,1) a variável GEH apresentada pelos animais: $GEH_{\text{estimado}} = 1,751 + 0,010^{**} PF - 0,033^{\Delta} GLI - 1,241^{\Delta} ALB + 0,246^{*} HDL - 0,061^{*} LDL + 1,703^{*} LDL/HDL - 0,102^{*} VLDL + 0,002^{*} FA$.

Em que: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 e ^Δp ≤ 0,10; PF = peso final do animal; GLI = glicemia; ALB = albumina; HDL-c = colesterol HDL; LDL-c = colesterol LDL; LDL-c/HDL-c = relação LDL-c/HDL-c; VLDL-c = colesterol VLDL; FA = fosfatase alcalina.

O modelo de regressão linear multivariado apresentou como média estimada 1,75 para a variável dependente GEH. Em relação ao PF houve acréscimo linear de 0,01 ponto percentual no GEH estimado ($p < 0,01$). Para a glicemia, houve decréscimo linear de 0,03 ($p < 0,1$). O mesmo ocorreu para as variáveis explicativas: albumina, LDL-c e VLDL-c, cujos decréscimos nos GEH foram iguais a 1,24 ($p < 0,1$), 0,06 ($p < 0,05$) e 0,1 ($p < 0,05$). Entretanto, observou-se incremento linear para HDL-c (0,25; $p < 0,05$), relação LDL-c/HDL-c (1,7; $p < 0,05$) e FA (0,002; $p < 0,05$).

O grau de ajuste do modelo regressivo apresentou coeficiente de determinação (R^2) igual a 69,3%.

DISCUSSÃO

Na investigação das razões pelas quais os animais de diferentes grupos do presente estudo apresentaram EH macrovesicular, deve ser descartada a hipótese de toxicidade do óleo experimental, visto que até mesmo aqueles do grupo TAGC₇0 desenvolveram a lesão. Adicionalmente, apresentaram o dobro do número de casos graves de EH, em relação ao observado no grupo TAGC₇50, situação ratificada pela análise de regressão linear simples, que mostrou que o acréscimo do óleo experimental reduziu a gravidade da EH em 10% e 16,6%, para 30% e 50% de substituição, respectivamente, evidenciando potencial efeito protetor do óleo rico em triptanoína, na gravidade da EH. Um surto de infecção viral ou fatores ambientais outros que pudessem ter desencadeado o fenômeno devem ser igualmente descartados, dada a ausência de EH no grupo-controle.

Vários fatores podem estar relacionados ao efeito protetor observado, entre eles, deve-se considerar que os produtos da digestão da di e da triptanoínas, por serem constituídas por AGCM, não são significativamente incorporados nos quilomícrons (25). Além disso, os AGCM são mais solúveis em água, mais rapidamente oxidados durante o repouso e o exercício e são transportados para a matriz mitocondrial independentemente do sistema carnitina palmitoil-transferase (CPT), constituindo rápida fonte de energia, com predomínio da termólise em detrimento da termogênese, em contraste com os AGCL. Portanto, os AGCM têm menor eficiência energética, produzindo 8,3 kcal/g contra as 9 kcal/g, em média, para os AGCL. Todas estas características metabólicas contribuem para me-

nor deposição gordurosa a partir dos TCM da dieta, razão pela qual têm sido utilizados na perda de peso, durante dieta hipocalórica (17,25).

Adicionalmente, um grupo de pesquisadores demonstrou, em ratos, que a deposição aguda ou crônica de gordura no fígado está associada à peroxidação lipídica, ou seja, que o grau de peroxidação é proporcional à gravidade da EH (26). Por esta razão, os animais do grupo TAGC₇0, que receberam dieta cuja fonte de lipídios era exclusivamente o óleo de soja, e apresentou 80% de casos graves de EH, contra 40% no grupo TAGC₇50, possivelmente estava sob maior risco, uma vez que a peroxidação lipídica constitui o segundo *hit*, na hipótese de Day e James (27) de evolução de EH para EHNA.

A EH está normalmente associada à obesidade, à intolerância à glicose e/ou à hiperinsulinemia e à hipertrigliceridemia, com ou sem redução dos níveis de HDL. É, considerada, atualmente, um componente da síndrome de resistência à insulina (RI) e o componente hepático da síndrome metabólica (28,29), pois, estados de RI promovem as condições predisponentes para a infiltração gordurosa no fígado (30-32).

Não obstante a estreita relação entre RI, obesidade e EH, a avaliação do peso corporal final dos animais não revelou diferenças significativas entre os grupos de animais com diferentes níveis de substituição dietética e o grupo-controle. No entanto, foi observada correlação linear positiva altamente significativa entre peso final e graus de EH ($r = 0,6$; $p < 0,001$) e efeito redutor da substituição dietética pelo óleo experimental sobre o ganho de peso corporal.

O percentual de lipídios hepáticos, conforme o esperado, foi significativamente mais elevado nos animais com EH, que naqueles do grupo-controle. Entretanto, a análise do peso do fígado dos animais, variável altamente correlacionada com os graus de EH, mostrou que a substituição pelo óleo experimental no nível de 50%, grupo TAGC₇50, resultou peso absoluto e relativo do órgão semelhante aos animais do grupo-controle.

Estudos sugerem que a lipogênese hepática aumentada é anormalidade metabólica importante subjacente à patogênese da EH, especialmente nos fígados insulino-resistentes. A lipogênese aumentada pode causar alterações metabólicas que conduzam a teor hepático aumentado de TAG. A primeira alteração é direta: a síntese aumentada dos TAG; a segunda, indireta: a produção aumentada de malonil-CoA, que inibe a CPT-1

e a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, reduzindo, assim, a β -oxidação e contribuindo para o acúmulo de AG e de TAG no fígado (17,25).

Dessa forma, o acúmulo de lipídios no hepatócito pode ser resultante também da inibição da CTP-1; assim, o uso de di e triptanoínas pode ter contribuído para a redução da gravidade do fenômeno por meio desse mecanismo, uma vez que fornecem AGCM, que prescindem do transporte da carnitina.

Curiosamente, os níveis glicêmicos dos animais que receberam o óleo experimental, grupos TAGC₇30 e TAGC₇50, foram significativamente maiores que os do grupo-controle. A elevação foi diretamente relacionada ao nível de substituição dietética. Alguns estudos relacionam a ingestão de TCM à melhora da captação de glicose, mediada pela insulina. Eckel e cols. (33) submetem indivíduos diabéticos tipo 2 a uma dieta rica em TCM, para observar o efeito sobre o metabolismo da glicose. A quantidade de glicose necessária para a manutenção da glicemia, durante a infusão constante de insulina, foi aumentada em 30% nesses indivíduos. Acredita-se que a administração de TCM pode ser estratégia dietética promissora para o tratamento do diabetes melito tipo 2, que constitui um dos fatores envolvidos na etiologia da EH (25). As razões pelas quais o óleo experimental promoveu elevação da glicemia podem estar relacionadas às suas propriedades anapleróticas, estimulando a gliconeogênese a partir da produção de succinil-CoA, oriundo do propionil-CoA, fornecendo oxaloacetato.

Apesar de a prevalência de hiperlipidemia, especialmente hipertrigliceridemia, na DFGNA ser variável, de 20% a 92%, e o excesso de colesterol contribuir com a elevação do acúmulo hepático de lipídios (34), o perfil lipídico sérico, particularmente os níveis de colesterol total, LDL-c e relação LDL-c/HDL-c, foram mais elevados no grupo-controle, que naqueles que apresentaram EH. Os níveis de TAG e VLDL-c, no entanto, não diferiram entre os grupos experimentais com EH e o grupo-controle. Isso ratifica o trabalho de Gauthier, Favier e Lavoie (35), que levantaram a hipótese de que o fígado age como amortecedor sistêmico, aumentando seu percentual de lipídios e prevenindo a elevação sérica de TAG.

Os níveis de HDL-c no grupo TAGC₇0 apresentaram tendência de redução, quando comparados com o grupo-controle ($p = 0,051$). Parece existir relação inversa entre os níveis de HDL-c e a intensidade da EH (33), o que poderia explicar tal achado.

Uma observação interessante neste estudo, que pode contribuir para a discussão do quadro de EH

encontrado, relaciona-se aos níveis séricos de proteínas totais. Os animais que receberam a dieta AIN-93, com ou sem substituição pelo óleo experimental, apresentaram níveis significativamente mais reduzidos de proteínas totais, quando comparados ao grupo-controle ($p < 0,001$). No entanto, esta diferença pode não representar significado fisiológico importante, pois os níveis encontrados nos grupos TAGC₇0, TAGC₇30 e TAGC₇50 estão dentro de padrões de referência (35,36) e, os do grupo-controle, pouco acima deles.

Os valores de proteínas séricas totais variam, conforme o método aqui adotado (Synermed®), de acordo com a idade, o sexo e a dieta consumida. Uma vez que os animais eram todos de mesma idade e sexo, resta a variável dieta a ser analisada. As dietas fundamentadas na AIN-93 tinham a caseína como fonte protéica, suplementada com aminoácido sulfurado, nos teores de 20% e 14%, para os períodos de crescimento e idade adulta dos animais, respectivamente. A dieta controle, por sua vez, era composta por farinha de peixe suplementada com aminoácido, não especificado no rótulo do produto, com proporção mínima de proteína bruta de 23%, do desmame até a idade adulta dos animais, o que pode ter contribuído com as diferenças entre os níveis de proteínas séricas totais aqui observadas. Não obstante o exposto, foi observada correlação negativa significativa ($r = -0,58$; $p < 0,001$) entre proteínas totais e graus de EH, que merece investigação adicional, apesar de não haver associação estabelecida entre lesão hepática e níveis séricos de proteínas totais.

Uma vez que os níveis séricos de albumina não diferiram entre os grupos submetidos à substituição dietética e o grupo-controle, pode-se sugerir ausência de diminuição da capacidade de síntese do hepatócito, com preservação da função hepática, não obstante as alterações observadas nos animais com EH.

Apesar de, atualmente, a EH ser a principal causa de elevação das aminotransferases (37), os níveis séricos de ALT, AST, relação AST/ALT, e, ainda, FA e GGT, não diferiram entre os animais do grupo-controle e os dos grupos TAGC₇0, TAGC₇30 e TAGC₇50. Observou-se, apenas, tendência de níveis de AST mais elevados nos animais TAGC₇0 ($p = 0,051$).

As aminotransferases estão presentes, em altas concentrações, no músculo, no fígado e no cérebro. A elevação da atividade dessas enzimas no sangue indica necrose ou moléstia, especialmente nesses tecidos (37). Segundo Ockner (38), a elevação dos níveis da ALT é relativamente específica da doença hepatobiliar. Apesar

de os níveis de AST poderem estar aumentados nas doenças de outros órgãos, valores mais de dez vezes acima do limite superior de variação normal refletem, habitualmente, patologia hepática ou biliar. Os valores das aminotransferases são úteis para monitorar a evolução da hepatopatia parenquimal aguda ou crônica. A ALT é encontrada, principalmente, no citoplasma do hepatócito, enquanto 80% da AST está presente na mitocôndria. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e no prognóstico de doenças hepáticas. Em dano hepatocelular leve, a forma predominante no soro é a citoplasmática, e em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial, elevando a relação AST/ALT (39).

Na EH, as provas de lesão hepática são variáveis podendo até mesmo não apresentar nenhuma anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Os níveis de ALT podem apresentar-se levemente aumentados, até duas vezes, e, os de AST, até cinco vezes, especialmente nos graus mais intensos de metamorfose gordurosa (40). Isso poderia justificar a ausência de diferenças significativas entre os animais que apresentaram ou não EH, neste estudo.

A causa mais comum de elevação da GGT sérica é a hepatopatia ativa; sua atividade é afetada tanto pela lesão aguda da célula hepática quanto pela obstrução do trato biliar (40). Além da colestase, a GGT encontra-se elevada nas lesões hepáticas inflamatórias e nos casos em que a atividade do citocromo P-450 tenha sido induzida pelo álcool ou outras substâncias tóxicas (40). A ausência de elevação dos níveis de GGT nos grupos submetidos à substituição dietética corrobora com a afirmação de ausência de efeito tóxico do óleo experimental.

Embora os níveis de FA não tenham diferido, observou-se correlação positiva significativa com graus de EH ($r = 0,43$; $p < 0,01$), o que permitiu sugerir influência da infiltração gordurosa sobre os níveis de FA, neste estudo.

O modelo de regressão linear multivariado adotado revelou que as variáveis de maior relação com os graus de EH aqui observados foram: peso final, diretamente proporcional, conforme esperado; glicemia, de maneira curiosa, inversamente proporcional, contrastando com a relação clássica entre EH observada na ausência de uso abusivo de álcool e glicemia; e, albumina, LDL-c e VLDL-c, inversamente proporcionais aos GEH. É importante considerar que a VLDL possa ser a lipoproteína responsável pela exportação de TAG do fígado (8).

Variáveis outras, como a distribuição de macronutrientes e o teor dietético de aminoácidos sulfurados e de fatores lipotróficos, devem ser igualmente conside-

rados na discussão da etiologia do quadro de EH, neste estudo. O grupo de investigação tem observado EH em ratos alimentados com a dieta AIN-93, em diferentes contextos (dados não publicados), sugerindo problemas com a sua composição, possivelmente no tocante à proporção de carboidratos e proteínas e à quantidade adicionada de aminoácidos sulfurados e colina, reconhecido fator lipotrófico. As razões pelas quais a dieta AIN-93 tem promovido EH, no entanto, necessitam ser esclarecidas. Ela parece induzir alterações relacionadas ao ganho de peso corporal e à deposição hepática de lipídios, traduzidas pelo peso absoluto e relativo do órgão, atenuadas, neste estudo, pela adição do óleo experimental, especialmente no maior nível de substituição.

O quadro de EH aqui observado parece ter sido induzido pela dieta-padrão adotada, AIN-93, por razões não inteiramente esclarecidas, possivelmente relacionadas à sua composição em macronutrientes, particularmente carboidratos e proteínas, aminoácidos sulfurados ou agentes lipotróficos. Tal quadro foi atenuado pela oferta do óleo experimental, principalmente no maior nível de substituição dietética.

Portanto, o consumo crônico de di e triptanoínas, em um contexto de substituição parcial do óleo da dieta, não promoveu efeito hepatotóxico, em ratos; antes, evidenciou-se efeito hepatoprotetor contra a EH nesses animais, em uma feição dose-dependente.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste artigo.

REFERÊNCIAS

1. Arrospide MT. Hígado graso no alcohólico. *Rev Gastroenterol Peru*. 2003;23(1):49-57.
2. Kang H, Greenon JK, Omo JT, Chao C, Peterman D, Anderson L, et al. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(10):2247-53.
3. Guidorizzi de Siqueira AC, Cotrim HP, Rocha R, Carvalho FM, Freitas LA, Barreto D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(8):837-41.
4. McCullough A. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2002;34(3):255-62.
5. Sanyal AJ. Mechanisms of disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2(1):46-53.
6. Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(1):63-70.
7. Herselman MG, Labadarios D, Rensburg CJV, Haffjee AA. Nutrição nas doenças do fígado. In: Gibney MJ, Elia, M, Ljun-

- gqvist O, Dowsett J, editors. *Nutrição clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 150-76.
8. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221-31.
 9. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath P. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology*. 2000;32:689-92.
 10. Caldwell SH, Oelsner DH, Lezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*. 1999;66:1-9.
 11. Nagao K, Inoue N, Wang YM, Shirouchi B, Yanagita T. Dietary Conjugated Linoleic Acid Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Zucker (fa/fa) Rats. *J Nutr*. 2005;135:9-13.
 12. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Can Med Assoc J*. 2005;172:899-905.
 13. Poniachik TJ, Mancilla CA, Contreras JB, Csendes AJ, Smok GS, Cavada GCH, et al. Obesidad: factor de riesgo para esteatohepatitis y fibrosis hepática. *Rev Med Chil*. 2002;130:731-6.
 14. Tilg H, Kaser A. Treatment strategies in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2(3):148-55.
 15. Clark JM. Weight loss as a treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):39-43.
 16. Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32345-53.
 17. Barreiro MAA, Villar MEA, Suazo FM. Triglicéridos de cadena media en el tratamiento de obesidad. *Rev Salud Publ Nutric [periódico en Internet]*. 2004 [acceso em 2004 Dec 10] 5(2). Disponível em: <http://www.respyn.uanl.mx/v2/articulos/art.tcm.htm>.
 18. Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F, Brunengraber H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. *J Clin Invest*. 2002;110(2):259-69.
 19. Mochel F, Pascale DGT, Henri B, Kiman RP, Robier D, Chales R, et al. Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy. *Mol Genet Metab*. 2004;84:305-2.
 20. Ataíde, TR, Lima, MRF, Valentim, IB, Pinheiro, DM, Sant'Ana, AEG. Chemical synthesis of tricaproin, trienantin and tricaprylin. *Int J Food Sci Technol*. 2007;42:1504-8.
 21. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 diet. *J Nutr*. 1997;127(5):838-41.
 22. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *J Publ Health Trop Med*. 1934;9:283-98.
 23. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
 24. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-7.
 25. Ferreira AMD, Barbosa PEB, Ceddia RB. A influência da suplementação de triglicéridos de cadeia média no desempenho em exercícios de ultra-resistência. *Rev Bras Med Esporte*. 2003;9(6):413-9.
 26. Reis KAA, Roquete MLV, Penna FJ. Esteatohepatite não-alcoólica na infância e adolescência: revisão. *Pediatria*. 2001;23(4):329-39.
 27. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114:842-4.
 28. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell, GC. NASH and insulin resistance: insulin hypersecretions and association with the insulin syndrome. *Hepatology*. 2001;35(2):373-9.
 29. Busetto L, Tregnaghi A, Marchi F, Segato G, Foletto M, Sergi G, et al. Liver volume and visceral obesity in women with hepatic steatosis undergoing gastric banding. *Obes Res*. 2002;10(5):408-11.
 30. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005;143:722-8.
 31. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 2001;120:1183-92.
 32. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):230-8.
 33. Eckel RH, Hanson AS, Chen Ay, Berman JN, Yost TJ, Brass EP. Dietary substitution of medium chain triglycerides improves insulin-mediated glucose metabolism in NIDDM subjects. *Diabetes*. 1992;41:641-7.
 34. Parise ER, Santos VN. Importância clínica da esteatose hepática. In: Castro LP, Savassi-Rocha PR, Galizzi Filho J, Lima AS, editores. *Tópicos em Gastroenterologia*. 9. ed. Belo Horizonte; 1999. p. 473-8.
 35. Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr*. 2006;95(2):273-81.
 36. Harkness JE, Wagner EJ. *Biologia Clínica de Coelho e Rodes*. 3. ed. São Paulo: Ed. Roca; 1993.
 37. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper: Bioquímica*. 7. ed. São Paulo: Atheneu; 1994.
 38. Ockner RK. Doenças do fígado, da vesícula biliar e dos ductos biliares. In: Wyngaarden JB, editor. *Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
 39. Motta VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. Porto Alegre: Ed. Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial; 2003.
 40. Ravel R. *Laboratório clínico. Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Endereço para correspondência:

Maria Adriana Firmino da Silva
Av. Gustavo Paiva, 3438, bloco 04, apto. 304 - Mangabeiras
57031-530 Maceió AL
E-mail: adrianafirmino@yahoo.com.br