Analícia Rocha Santos

Efeitos de dietas com baixo teor de gordura e com gordura de coco de babaçu sobre as alterações lipídicas e sobre a lesão hepática na cirrose biliar secundária em ratos jovens

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em "Fisiopatologia em Clínica Médica" – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Rabello Coelho

Botucatu – SP
2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher".

Cora Coralina

Dedico este trabalho,

Aos meus queridos pais, Aurino Dias dos Santos e Aureniza Rocha Santos, que sempre me apoiaram e, o mais importante, me ensinaram diversas lições que não podem ser encontradas em livros.

Aos meus irmãos, Audízio, Audízia e Aurenize e aos meus cunhados, Adailton e Cláudia, sempre me encorajando e compartilhando todas as conquistas.

Aos meus amados sobrinhos, Alex Matheus, André Lucas, Ana Luíza e Luiz Gabriel, que trouxeram mais alegria e felicidade a todos da família.

Ao meu amor Rogério Freire, pela paciência, cuidado, carinho e por saber esperar os momentos de felicidade que a vida ainda nos proporcionará.

Dedico ainda àqueles que pude conviver diariamente bem como àqueles que estavam distantes, familiares e eternos amigos, pelas orações e pelo apoio emocional constante.

Agradeço a Deus, por conceder-me sabedoria e força em todos os momentos de minha vida.

Agradeço a todos que participaram da realização deste trabalho.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Antonio Rabello Coelho, *por sua competência, dedicação, atenção, respeito e, sobretudo, pelo apoio desde o início dessa caminhada.*

Aos docentes do Departamento de Clinica Médica e do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp, *pelo conhecimento transmitido durante o curso de Pós-graduação.*

Aos funcionários do Departamento de Pediatria da Unesp-Botucatu, *Adriana Tavares, Fabiano Michelin, Marcelo Alves, Maria do Carmo S. Oliveira e Paulo César Lopes, pelo estímulo e ajuda sempre demonstrada.*

Aos funcionários do Departamento de Clinica Médica da Unesp-Botucatu, principalmente, à Ana Maria Mengue, *pela presteza em todos os momentos requisitados.*

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, *Nathanael Pinheiro Salles, Regina Célia Spadin, Lílian Cristina Nunes e Janete Aparecida H. Nunes, pela atenção e colaboração durante todo o período de Pós-graduação.*

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Pediatria da Unesp-Botucatu, *Alvina F. Ramos, Cristina Rezende, Neuza M. Ferreira, Paulo S. Dionisio e Regina M. de Oliveira, pela amizade e enorme auxílio na realização do trabalho experimental.*

À Maria Salete Sartori, *responsável pelo Laboratório de Bioquímica do Setor de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp, pela realização dos exames bioquímicos.*

À Profª. Drª. Kunie Labuki Rabello Coelho, *professora da Disciplina de Histopatologia Hepática do Curso de Pós-graduação em Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp, pela orientação e apoio nas análises histológicas.*

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/ Unesp, *Paulo Roberto Cardoso e Maria Luiza F. Ardanaz, pela preparação das lâminas histológicas.*

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente e sua equipe do Grupo de Apoio a Pesquisa (GAP) da Unesp-Botucatu, *pela colaboração nas análises estatísticas.*

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp-Botucatu, especialmente, à Selma Maria de Jesus, *pela confecção da ficha catalográfica.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), *pela bolsa de estudo outorgada.*

Finalmente, agradeço às amigas de Pós-graduação, Ana Paula Battochio, Andréa Pereira, Adriane Gasparino e Cynthia Passoni, *pela troca de conhecimentos, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.*

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS ix
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS xi
RESUMO xii
ABSTRACT xiii
1. INTRODUÇÃO 1
1.1. CONCEITO DE COLESTASE 1
1.2. IMPORTÂNCIA DA COLESTASE 2
1.3. CAUSAS DE COLESTASE 2
1.4. ATRESIA BILIAR 5
1.5. CONSEQÜÊNCIAS DA DIMINUIÇÃO OU AUSÊNCIA DE COMPONENTES DA BILE NO INTESTINO 6
1.5.1. Esteatorréia 6
1.5.2. Desnutrição 6
1.5.3. Deficiência de ácidos graxos essenciais 7
1.5.4. Deficiência de vitaminas lipossolúveis 8
1.5.5. Acolia ou hipocoia fecal 10
1.6. CONSEQÜÊNCIAS HEPÁTICAS DA RETENÇÃO DE CONSTITUINTES DA BILE 11
1.6.1. Apoptose 11
1.6.2. Necrose 12
1.6.3. Fibrose 13
1.6.4. Proliferação ductal 14
1.7. CONSEQÜÊNCIAS SISTÊMICAS DA RETENÇÃO DE CONSTITUINTES DA BILE 14
1.7.1. Icterícia 14
1.7.2. Colúria 15
1.7.3. Prurido 15
1.7.4. Hipercolesterolemia e Xantomas 16
1.7.5. Hipertrigliceridemia 16
1.8. MODELOS EXPERIMENTAIS DE COLESTASE 17
1.9. TRATAMENTO DIETOTERÁPICO NA COLESTASE 17
1.9.1. Aspectos nutricionais e metabólicos dos TCM 18
1.9.2. Fontes, preparação e propriedades dos TCM 18
1.9.3. Estudos experimentais com diferentes dietas 19

2. OBJETIVOS 21
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 22
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 22
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS..... 23
3.3. FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO..... 23
3.3.1. Composição das rações..... 25
3.4. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS..... 29
3.4.1. Ligadura e ressecção do ducto biliar comum 29
3.4.2. Operação simulada 30
3.5. EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO..... 30
3.5.1. Acasalamento e diagnóstico de prenhez..... 31
3.5.2. Cuidados e manutenção dos animais..... 31
3.5.3. Eutanásia 31
3.6. OBSERVAÇÕES E MEDIDAS 32
3.6.1. Tempo de sono pelo pentobarbital..... 32
3.6.2. Análise dos órgãos..... 32
3.6.3. Exames Bioquímicos..... 33
3.6.4. Análise Histológica 34
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 35
4. RESULTADOS..... 36
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 63
6. CONCLUSÕES 69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Causas de colestase na infância 3
Quadro 2: Composição de ácidos graxos das gorduras fontes de TCM 19
Quadro 3: Composição da gordura de coco brasil. 24
Quadro 4: Conteúdo de triacilgliceróis de cadeia média (TCM), triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) e ácidos graxos essenciais (AGE) das gorduras. 25
Quadro 5: Composição das rações. 25
a no quadro 5: Mistura salina 26
b no quadro 5: Mistura vitamínica 27
Quadro 6: Distribuição de calorias fornecidas em cada ração. 26
Quadro 7: Quantidade de AGE fornecida em cada dieta. 26
Quadro 8 – Descrição da técnica cirúrgica adaptada. 29
Tabela 1: Níveis séricos de colesterol total. 37
Tabela 2: Níveis séricos de HDL-c. 38
Tabela 3: Níveis séricos de LDL-c. 39
Tabela 4: Níveis séricos de VLDL-c. 40
Tabela 5: Níveis séricos de triacilgliceróis. 41
Tabela 6: Níveis séricos de vitamina A. 42
Tabela 7: Tempo de sono. 43
Tabela 8: Atividade sérica de AST. 44
Tabela 9: Atividade sérica de ALT. 45
Tabela 10: Níveis séricos de albumina. 46
Tabela 11: Níveis séricos de globulinas. 47
Tabela 12: Peso do fígado 48
Tabela 13: Conteúdo de água do fígado. 49
Tabela 14: Conteúdo de gordura do fígado. 50
Tabela 15: Peso do baço 51
Tabela 16: Conteúdo de água do baço. 52
Tabela 17: Conteúdo de gordura do baço. 53
Tabela 18: Intensidade da fibrose portal. 54
Tabela 19: Intensidade da proliferação ductal. 55
Tabela 20: Intensidade da fibrose pericelular. 56
Tabela 21: Intensidade da esteatose. 57
Tabela 22: Intensidade da degeneração hidrópica. 58
Tabela 23: Número de áreas de necrose. 59
Tabela 24: Freqüência de mitose. 60
Tabela 25: Correlação de *spearman* no grupo LSG 61
Tabela 26: Correlação de *spearman* no grupo LGC 62

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 – Composição de macronutrientes contidos nas rações..... 28
Figura 1 – Demonstração do procedimento cirúrgico..... 30
Figuras 2 e 3: Níveis séricos de colesterol total. 37
Figuras 4 e 5: Níveis séricos de HDL-c. 38
Figuras 6 e 7: Níveis séricos de LDL-c..... 39
Figuras 8 e 9: Níveis séricos de VLDL-c. 40
Figuras 10 e 11: Níveis séricos de triacilgliceróis..... 41
Figuras 12 e 13: Níveis séricos de vitamina A..... 42
Figuras 14 e 15: Tempo de sono..... 43
Figuras 16 e 17: Atividade sérica de AST. 44
Figuras 18 e 19: Atividade sérica de ALT..... 45
Figuras 20 e 21: Níveis séricos de albumina..... 46
Figuras 22 e 23: Níveis séricos de globulinas. 47
Figuras 24 e 25: Peso do fígado. 48
Figuras 26 e 27: Conteúdo de água do fígado. 49
Figuras 28 e 29: Conteúdo de gordura do fígado..... 5050
Figuras 30 e 31: Peso do baço..... 51
Figuras 32 e 33: Conteúdo de água do baço. 52
Figuras 34 e 35: Conteúdo de gordura do baço..... 53
Figuras 36 e 37: Intensidade da fibrose portal. 54
Figuras 38 e 39: Intensidade da proliferação ductal..... 55
Figuras 40 e 41: Intensidade da fibrose pericelular..... 56
Figuras 42 e 43: Intensidade da esteatose. 57
Figuras 44 e 45: Intensidade da degeneração hidrópica..... 58
Figuras 46 e 47: Número de áreas de necrose. 59
Figuras 48 e 49: Freqüência de mitose..... 60
Figura 50: Correlação de *Spearman* no grupo LSG 61
Figura 51: Correlação de *Spearman* no grupo LGC..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

©	*Copyright* (ing) = direitos autorais
®	Marca registrada
ω	Ômega
∴	Portanto
μg/dL	microgramas/decilitro
μmol/L	micromoles/litro
AA	Ácido araquidônico
AB	Atresia biliar
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
AGE	Ácidos graxos essenciais
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Amplitude de variação
CCK	Colecistoquinina
CT	Colesterol total
CV	Coeficiente de variação
DH	Degeneração hidrópica
DHA	Ácido docosahexaenóico
Dieta GC	Dieta com gordura de coco de babaçu
Dieta SG	Dieta com óleo de milho em baixa concentração
DP	Desvio padrão
E	Esteatose
et al.	*et alii* (latim) = e outros
F	Fibrose portal
FMB	Faculdade de Madicina de Botucatu
FP	Fiprose pericelular
g	Gramas
g/100g	gramas/100gramas
GH	*Growth hormone* = Hormônio de creascimento
HDL	*High density lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade
IGF-1	*Insulin-like Growth Factor 1* = fator de crescimento semelhante a insulina I
kcal	Quilocaloria
LDL	*Low density lipoprotein* - lipoproteína de baixa densidade
LGC	Grupo com colestase e dieta com gordura de coco de babaçu
LSG	Grupo com colestase e dieta com baixo teor de óleo de milho
mg/d	miligramas/dia
mg/dL	miligramas/decilitro
n.s.	Não significativa
p	Probabilidade
p de α	Nível de significância de α
PD	Proliferação ductal
Pn°	N° de dias pós-natal (ex. P21 = 21º dia pós-natal)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SGC	Grupo sem colestase e dieta com gordura de coco de babaçu
SSG	Grupo sem colestase e dieta com baixo teor de óleo de milho
TCL	Triacilgliceróis de cadeia longa
TCM	Triacilgliceróis de cadeia média
TG	Triacilgliceróis
UI/L	Unidades internacionais/litro
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VA	Vitamina A
VLDL	*Very low density lipoprotein* - lipoproteína de muito baixa densidade

EFEITOS DE DIETAS COM BAIXO TEOR DE GORDURA E COM GORDURA DE COCO DE BABAÇU SOBRE AS ALTERAÇÕES LIPÍDICAS E SOBRE A LESÃO HEPÁTICA NA CIRROSE BILIAR SECUNDÁRIA EM RATOS JOVENS

Introdução: a colestase diminui o fluxo da bile para o intestino resultando em má-absorção de gordura, colesterol e vitaminas lipossolúveis, quando prolongada causa cirrose biliar. A ligadura do ducto biliar em ratos jovens é usada como modelo de atresia biliar. Há duas possibilidades de tratamento dietoterápico dessa condição: substituição de triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) por triacilgliceróis de cadeia média (TCM) ou suprimento de TCL na quantidade suficiente para evitar deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) como única fonte de gordura. **Objetivo:** comparar os efeitos de uma dieta com baixo teor de gordura com uma dieta com gordura de coco de babaçu sobre o metabolismo lipídico, a função e a lesão hepática em ratos jovens com cirrose biliar secundária (CBS). **Métodos:** submetemos 40 ratos divididos em 4 grupos de 10 animais, a partir do P21 (21º dia pós-natal) até o P49, a dois dos seguintes tratamentos: 1) ligadura e ressecção do ducto biliar comum (L) ou operação simulada (S) e 2) dieta com baixo teor de gordura (óleo de milho fornecendo 4,5% da quantidade total de calorias, dieta SG) ou dieta com gordura de coco de babaçu (essa gordura fornecendo 32,7% e óleo de milho fornecendo 1,7% da quantidade total de calorias, dieta GC). Ambas dietas contêm a quantidade mínima de AGE. O valor calórico da dieta SG é 372,8 kcal/100g e da dieta GC é 396,1 kcal/100g. Levando em conta a quantidade de TCL que não é absorvida na ausência de bile, as dietas são isocalóricas. No P48 foi realizado o teste do tempo de sono induzido pelo pentobarbital, com injeção intraperitonial na dose de 50mg/kg de peso do animal. No P49 foi colhido sangue por punção cardíaca para as seguintes determinações: atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT), concentrações séricas de colesterol total (CT) e frações, triacilgliceróis (TG), vitamina A (VA), albumina e globulina. Foram determinados o peso, o conteúdo de água e de gordura do fígado e do baço e retirado um fragmento do lobo direito do fígado para análise histológica pelo método semiquantitativo. Às intensidades de fibrose (F), proliferação ductal (PD), fibrose pericelular (FP), esteatose (E) e degeneração hidrópica (DH) foram atribuídos, para cada animal, escores de 0 a 3. Foram contados o número de áreas de necrose em todo o corte e o número de mitoses em dez campos seqüenciais com grande aumento. Aplicou-se ANOVA com dois fatores e comparações múltiplas pareadas pelo teste t. Às variáveis histológicas foram aplicados o teste de Wilcoxon e correlação de Spearman para os grupos LSG e LGC. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas cujo $p<0,05$. **Resultados:** a dieta GC aumentou o CT tanto na presença como na ausência de colestase. A dieta SG evitou os efeitos da colestase sobre a elevação de LDL-c, VLDL-c e TG, aumentou a VA sérica e diminuiu a F e a PD na colestase. Houve correlação negativa entre mitose e F, PD, FP e E no grupo LSG. **Conclusões:** a dieta GC tem efeito hipercolesterolêmico tanto na presença como na ausência de colestase. A dieta SG diminui a intensidade da F e da PD e está associada ao aumento de VA na CBS.

Palavras-chave: Colestase obstrutiva. Cirrose biliar. Gordura de babaçu. Triacilgliceróis de cadeia média. Triacilgliceróis de cadeia longa.

EFFECTS OF LOW FAT AND BABASSU FAT DIETS ON LIPID ALTERATIONS AND HEPATIC INJURY IN SECONDARY BILIARY CIRRHOSIS IN YOUNG RATS

Introduction: cholestasis decreases bile flow into the duodenum resulting in fat, cholesterol and lipid-soluble vitamins malabsorption, prolonged cholestasis causes biliary cirrhosis. Bile duct ligation in young rats is used as model for biliary atresia. There are two possibilities of dietetic treatment of this condition: substitution of medium chain triacylglycerols (MCT) for long chain triacylglycerols (LCT) or supply of LCT in amount enough to prevent essential fatty acids (EFA) deficiency as only fat source. **Objective:** to compare, the effects of a low fat diet with those of a babassu fat diet on lipid metabolism, liver function and hepatic injury in young rats with secondary biliary cirrhosis (SBC). **Methods:** we submitted 40 rats in 4 groups of 10 animals each from the P21 (21st postnatal day) to P49 to two of the following treatments: 1) ligature and resection of the common bile duct (L) or sham operation (S) and 2) low fat diet (corn oil supplying 4.5% of the total amount of energy, LF diet) or babassu fat diet (this fat supplying 32.7% and corn oil supplying 1.7% of the total amount of energy, BF diet). Both diets contain EFA in the appropriate amount. The amount of energy of the LF diet is 372.8 kcal/100g and of the BF diet is 396.1 kcal/100g. Taking into account the amount of LCT that is not absorbed in the absence of bile, the diets are isocaloric. At P48 pentobarbital sleeping time was measured after intraperitoneal injection in the dose of 50mg/kg of body weight. At P49 blood was collected through cardiac puncture for determination of: serum activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), serum concentrations of total cholesterol (TC) and fractions, triacylglycerols (TG), vitamin A (VA), albumin and globulins. The weight, the water and fat content of the liver and spleen were determined and a fragment of the right lobe of the liver was taken for semiquantitative histological analysis. For the intensity of fibrosis (F), ductal proliferation (DP), pericellular fibrosis (PF), steatosis (S) and hidropic degeneration (HD) scores of 0 to 3 were attributed for each animal. The number of areas of necrosis in the whole slide and the number of mitosis in ten sequential fields at high magnification, were counted. Two Way ANOVA and paired multiple comparisons using t test were applied. Wilcoxon test and Spearman correlation for the groups LLF and LBF were applied to the histological variables. Differences were considered statistically significant whose $p<0.05$. **Results:** BF diet increased the TC in cholestasis and also without cholestasis. LF diet prevented the effects of cholestasis on the increase of LDL-c, VLDL-c and TG, increased the serum VA and decreased the F and the DP in cholestasis. There was a negative correlation between mitosis and F, DP, PF and S in the group LLF. **Conclusions:** BF diet has hipercholesterolemic effect either in association or not with cholestasis. LF diet decreases the intensity of F and of DP and is associated with the increase of VA in the SBC.

Key words: Obstructive cholestasis. Biliary cirrhosis. Babassu fat. Medium chain triacylglycerols. Long chain triacylglycerols.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITO DE COLESTASE

O termo colestase, que é originado do grego (*chole* = bile e *stasis* = parada) (ERLINGER, 1999), significa toda alteração fisiopatológica em que há diminuição ou ausência do fluxo biliar, por defeitos na secreção da bile ou por interferência no seu transporte para o duodeno (POPPER, 1968; ERLINGER, 1999; KULLAK-UBLICK & MEIER, 2000; POUPON et al., 2000; ROQUETE, 2000; TOMAR, 2000). Esse processo ocorre devido à obstrução dos ductos biliares (extra- ou intra-hepáticos) ou a anormalidades das células hepáticas (REICHEN & SIMON, 1994; ERLINGER, 1991; ERLINGER, 1999). A identificação da colestase varia de acordo com a perspectiva do examinador.

Para o clínico, a presença de colestase é indicada por icterícia, colúria e xantomas (decorrentes da retenção de constituintes da bile), acolia ou hipocolia fecal (causada pela ausência ou diminuição de bile no intestino) e prurido (ERLINGER, 1999).

Bioquimicamente, a colestase se manifesta por aumento no soro da concentração de bilirrubina conjugada, ácidos biliares e colesterol, substâncias normalmente excretadas na bile e pelo aumento da atividade sérica de fosfatase alcalina, γ-glutamiltransferase (REICHEN & SIMON, 1994; COELHO, 1995; LI & CRAWFORD, 2004).

Para o patologista, colestase significa presença de pigmentos biliares no citoplasma dos hepatócitos, das células de Küpffer e trombos biliares canaliculares (bilirrubinostase) e degeneração plumosa dos hepatócitos (colatoestase) (REICHEN & SIMON, 1994; DESMET, 1995).

O fisiologista define colestase pelo *clearance* de substâncias coléfilas (p. ex. inulina) está diminuído (ERLINGER, 1991; KRELL & ENDERLE, 1993).

O radiologista identifica a colestase quando há parada de contraste na colangiopancreatografia endoscópica retrógrada ou na colangiografia operatória (HEYMAN et al., 1988; DERKX et al., 1994; OHNUMA et al., 1997).

1.2. IMPORTÂNCIA DA COLESTASE

A colestase ocorre tanto na prática clínica de crianças, quanto na de adultos (POUPON et al., 2000; LI & CRAWFORD, 2004). Em crianças, a colestase é observada principalmente no período neonatal e nos primeiros meses de lactância (CAUDURO, 2003). A incidência de colestase neonatal é em torno de 1 em 2000 a 2500 nascidos vivos (MOWAT, 1994).

As doenças hepáticas têm significância na saúde total dos americanos e são particularmente insidiosas quando atingem crianças. Em 1999, foram realizados 525 transplantes de fígado em crianças nos Estados Unidos, e mais de 80% destas crianças eram menores de 5 anos (BERK & BROWNSTEIN, 2002).

As crianças são particularmente vulneráveis a colestase em parte por imaturidade dos mecanismos de formação da bile (WATSON & GIACOIA, 1983; COELHO, 1995; KARRER & BENSARD, 2000; ROQUETE, 2000). Além disso, a evolução para a cirrose, quando ocorre, é mais rápida do que em adultos (BURDELSKI, 1995).

A importância do estudo da colestase em Pediatria deve-se à gravidade de algumas doenças colestáticas, como a atresia de vias biliares (SHAH & SPIVAK, 1994; BALISTRERI et al., 1996; PERLMUTTER & SHEPHERD, 2002; CAUDURO, 2003) e as colestases familiares intra-hepáticas progressivas (SHNEIDER, 2004), que apresentam 100% de mortalidade na ausência de tratamento. Portanto, necessitam de diagnóstico rápido e preciso, além de tratamento específico (LAI et al., 1994; BURDELSKI, 1995; MCKIERNAN, 2002). Sua importância é acentuada pela ampla variedade de causas congênitas e adquiridas (REICHEN & SIMON, 1994; ROQUETE, 2000).

1.3. CAUSAS DE COLESTASE

As causas de colestase são multifatoriais e podem ser desencadeadas nas diferentes etapas da formação da bile ou do fluxo biliar (WATSON & GIACOIA, 1983; KRELL & ENDERLE, 1993; JANSEN & MULLER, 2000). O Quadro 1 mostra as causas de colestase neonatal divididas em extra-hepáticas e intra-hepáticas, sendo a atresia biliar e a hepatite neonatal as mais freqüentes (REICHEN & SIMON, 1994), correspondendo 70% a 80% dos casos (SHAH & SPIVAK, 1994; CAUDURO, 2003).

Quadro 1. CAUSAS DE COLESTASE NA INFÂNCIA

CAUSAS EXTRA-HEPÁTICAS
- Obstrução biliar
  - Atresia biliar
  - Cisto de colédoco
  - Perfuração espontânea do ducto biliar
  - Estenose biliar
  - Anomalias da junção ductal colédoco-pancreática
  - Hipoplasia biliar
  - Síndrome da bile espessa
  - Colelitíase
  - Tumores/Massas

CAUSAS INTRA-HEPÁTICAS DUCTAIS
- Obstrução biliar
  - Fibrose hepática congênita
  - Malformação da placa ductal
  - Doença renal policística
  - Doença de Caroli
  - Cisto hepático
- Síndromes ductopênicas
  - Ductopenia sindrômica (Síndrome de Alagille)
  - Ductopenia não sindrômica
- Endocrinopatias
  - Hipotireoidismo
  - Hipopituitarismo (displasia septo-óptica)
- Fibrose cística
- Histiocitose de células de Langerhans
- Síndrome Hiper-IgM

CAUSAS INTRA-HEPÁTICAS HEPATOCÍTICAS
- Hepatite neonatal idiopática
- Infecções congênitas
  - Virais
    - Citomegalovírus
    - Rubéola
    - Reovirus tipo 3
    - Herpes vírus: simples 1 e 2, zóster, tipo 6
    - Adenovírus
    - Enterovírus
    - Parvovírus B19
    - Vírus Coxsackie
    - Vírus ECHO
    - Vírus da imunodeficiência humana
    - Vírus das hepatites B, C e TT (TAJIRI et al., 2001)
  - Bacterianas
    - Sífilis
    - Listeriose
    - Toxoplasmose
    - Tuberculose
    - Malária
- Infecções adquiridas
  - Sepsis bacteriana
  - Infecção do trato urinário (bactérias gram negativas)
- Colestase associada à nutrição parenteral

(continua na próxima página)

- Síndromes colestáticas genéticas
  - Colestases intra-hepáticas familiares progressivas
    - Tipo 1 – Mutação do gene FIC1 - Doença dos Byler (alteração do transporte de aminofosfolipídios dentro da membrana canalicular)
    - Tipo 2 – deficiência de cBSEP - "*canalicular bile salt export pump*" (alteração do transporte de ácidos biliares)
    - Tipo 3 – deficiência de MDR3 - "*multidrug resistence fator number 3*" (alteração do transporte de fosfatidilcolina)
  - Colestase hereditária com linfedema (Síndrome de Aagenaes)
  - Colestase familiar dos Índios Norte-Americanos
  - Colestase dos esquimós da Groenlândia
  - Colestase familiar benigna recorrente
  - Síndrome de Dubin-Johnson
- Doenças metabólicas
  - Deficiência de α_1-antitripsina
  - Transtornos do metabolismo de carboidratos
    - Galactosemia
    - Intolerância hereditária à frutose
    - Glicogenose tipo IV
  - Transtornos do metabolismo de lipídios
    - Doença de Niemann-Pick
    - Doença de Gaucher
    - Doença de Wolman
    - Mucolipidose II (doença de células I) (HOCHMAN et al., 2001)
  - Transtornos do metabolismo de aminoácidos
    - Tirosinemia
    - Hipermetioninemia
  - Transtornos do ciclo da uréia
    - Deficiência de arginase
    - Deficiência de ornitina transcarbamilase
    - Deficiência de carbamoil fosfato sintetase
  - Transtornos da síntese de ácidos biliares
  - Distúrbios peroxissomais
    - Síndrome de Zellweger
    - Adrenoleucodistrofia
  - Enzimopatias mitocondriais
  - Doença do armazenamento de ferro neonatal
- Relacionadas com medicamentos (ex. carbamazepina) (FREY et al., 2002)
- Outras
  - Choque/hipoperfusão
  - Histiocitose X
  - Obstrução intestinal
  - Linfohistiocitose eritrofagocítica
  - Lupus eritrematoso neonatal
  - Cirrose infantil da Índia
  - Oxigenação com membrana extracorpórea
  - Trissomias autossômicas
  - Doença venoclusiva
  - Hemocromatose neonatal
  - Síndrome de *prune-belly*
  - Colestase neonatal associada a vasculopatia trombótica (DAHMS et al., 2002)

CAUSA EXTRA- HEPÁTICA E INTRA-HEPÁTICA

- Colangite esclerosante neonatal

Fonte: Modificado de SUCHY, 2001 e KARPEN, 2002 (as referências citadas correspondem a causas não incluídas nessas fontes).

1.4. ATRESIA BILIAR

A atresia biliar (AB), conseqüente ou a um processo inflamatório esclerosante obstrutivo dos ductos biliares – forma perinatal ou a má-formação das vias biliares – forma embrionária ou fetal (BALISTRERI et al., 2001; SOKOL & MACK, 2001; CAUDURO, 2003), é a causa mais importante de colestase na infância (BURDELSKI, 1995). Sem tratamento, a AB evolui para a morte, em razão de cirrose biliar, causando hipertensão portal (cuja conseqüência é a hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes esofagianas) e, eventualmente, carcinoma hepatocelular (CAUDURO, 2003). Além disso, é a mais freqüente indicação de transplante hepático pediátrico (YOON et al., 1997; OTTE, 2002).

A AB acomete 1 em 8.000 a 12.000 nascidos vivos no âmbito mundial com predominância do sexo feminino (BALISTRERI et al., 1996; CHAPCHAP, 2001), sendo a incidência em meninas de 1,4 a 1,7 vezes maior do que em meninos. Embora não existam estudos específicos no Brasil, pode-se estimar, pelo número de nascimentos, a ocorrência de 300 casos novos por ano no país (CHAPCHAP, 2001).

Anatomicamente, a AB é classificada em três tipos: **tipo 1**, a atresia compromete o ducto biliar comum com ductos proximais evidentes; **tipo 2**, a atresia compromete o ducto hepático, mantendo-se ductos proximais evidentes e **tipo 3**, a atresia compromete o ducto hepático direito e esquerdo e ainda o porta-hepatis (MOWAT, 1987). Os dois primeiros tipos correspondem a 12% dos casos e o tipo 3 é encontrado em 90% dos casos (CAUDURO, 2003).

Evidências histológicas de lesão hepática característica da AB são: proliferação ductal, formação de trombos nos ductos biliares interlobulares e fibrose delimitando nódulos cirróticos (BALISTRERI, 2000; HABER & RUSSO, 2003).

No tratamento da AB a portoenterostomia ou técnica de Kasai continua sendo a conduta inicial, o transplante hepático faz parte da segunda etapa do tratamento quando necessário. A correção cirúrgica mediante a técnica de Kasai, com o restabelecimento do fluxo biliar, permite evitar o desenvolvimento de cirrose biliar e insuficiência hepática secundária. A eficácia desta técnica se encontra diretamente relacionada com a precocidade em sua prática, sendo

melhor a evolução quando realizada entre 45 e 65 dias de vida (SHAH & SPIVAK, 1994; DONAT et al., 2004).

Após a cirurgia de Kasai muitos pacientes apresentam lesão hepática progressiva e em aproximadamente $^{1}/_{3}$ dos casos ocorre insuficiência hepática, necessitando de transplante em 12 a 14 meses de pós-operatório, e em outro $^{1}/_{3}$ durante a adolescência. Os restantes sobrevivem com algum grau de hepatopatia (RAMM et al., 1998).

1.5. CONSEQÜÊNCIAS DA DIMINUIÇÃO OU AUSÊNCIA DE COMPONENTES DA BILE NO INTESTINO

1.5.1. Esteatorréia

A esteatorréia consiste no aumento do conteúdo de gordura das fezes (>5g/dia), o que as torna soltas, pálidas ou amarelo-claro e de cheiro desagradável, de manteiga rançosa. A diminuição da concentração de ácidos biliares prejudica a formação de micelas e leva à solubilização inadequada de gorduras, resultando em má-absorção de lipídios e conseqüentemente esteatorréia (KAUFMAN et al., 1987; RAMIREZ & SOKOL, 1994; REICHEN & SIMON, 1994; KELLY, 1995; TERAN, 1999).

A média normal desejável da concentração de ácidos biliares no intestino é de 10 μmol/ L (variação de 5 a 30). Em pacientes com colestase e estatorréia a concentração média é de 2,5 μmol/L (ROS et al., 1984; LANSPA et al., 1985).

1.5.2. Desnutrição

A desnutrição, levando a restrição de crescimento, afeta 60% das crianças com doença hepática (BEATH et al., 1993; KELLY, 1997). Os mecanismos que levam à desnutrição na colestase crônica incluem:

- má-absorção de gordura, com importante diminuição no aproveitamento de energia da dieta (KAUFMAN et al., 1987; RAMIREZ & SOKOL, 1994; REICHEN & SIMON, 1994; KELLY, 1995; TERAN, 1999);
- anorexia, com diminuição da ingestão alimentar, decorrente do aumento dos

níveis circulantes de colecistoquinina (CCK), que estimula o núcleo de saciedade (PADILLO et al., 2001). Além disso, a CCK diminui a secreção ácida do estômago prejudicando o esvaziamento gástrico (SCHWIZER et al., 1997);

- saciedade precoce ou vômitos secundários à compressão abdominal pelo aumento do fígado e do baço ou por ascite (RAMIREZ & SOKOL, 1994);
- aumento do gasto energético (PIERRO et al., 1989; RAMIREZ & SOKOL, 1994; CARDOSO et al., 1997);
- diminuição da síntese de proteínas e catabolismo protéico acelerado (CARDOSO et al., 1997), resultando em balanço nitrogenado negativo e perda muscular;
- infecções recorrentes (RAMIREZ & SOKOL, 1994; CARDOSO et al., 1997);
- diminuição da síntese hepática do fator de crescimento semelhante a insulina I (Insulin-like Growth Factor I – IGF-I) (DESCOS et al., 1989; KATZ et al., 1991) e resistência ao hormônio de crescimento (Growth hormone – GH) (BUCUVALAS et al., 1990). A diminuição do IGF-I reduz a síntese protéica e a massa muscular (SHAPHERD, 1994). A resistência ao GH estimula a lipólise com perda dos estoques de gordura e diminui a velocidade de crescimento (BUCUVALAS et al., 1990).

A desnutrição em crianças com doença hepática crônica pode contribuir para deterioração hepática gradual que, em muito casos, leva à morte por falência hepática (SHEPHERD, 1994). Tem sido demonstrado que a desnutrição é o fator mais importante para a sobrevida, tanto no grupo de pacientes aguardando o transplante como no grupo pós-transplante. Nos casos sem indicação de transplante, prevenção ou tratamento de déficits nutricionais permitirá um melhor desenvolvimento pôndero-estatural e neuropsicomotor além de menor morbidade (SHEPHERD, 1994; CARDOSO et al., 1997).

1.5.3. Deficiência de ácidos graxos essenciais

Na colestase, a combinação entre má absorção de gordura e inadequada ingestão de energia pode levar à deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) (CHIN et al., 1992; RAMIREZ & SOKOL, 1994; SHEPHERD, 1994). Nessas condições, os ácidos graxos linoléico (ω-6) e α-linolênico (ω-3) ingeridos podem

ser preferencialmente oxidados para gerar energia (RAMIREZ & SOKOL, 1994), prejudicando a síntese do ácido araquidônico (AA) e docosahexaenóico (DHA) respectivamente.

O AA é precursor de mediadores bioquímicos (protaglandinas e tromboxanos da série 2 e leucotrienos da série 4) que têm forte efeito sobre vários aspectos da resposta imune, incluindo proliferação linfocitária, secreção de linfocinas, síntese da colagenase dos macrófagos, atividade das células *killer* e atividade tumoricida dos macrógagos (BELL et al.,1991). O DHA está presente em altas concentrações no córtex cerebral, nas membranas retinianas e nos segmentos externos dos fotorreceptores da retina humana, além de ser modulador da atividade do pigmento visual rodopsina (HAMOSH & SALEM, 1998; UAUY et al., 2001). A deficiência destes pode causar retardo de crescimento, trombocitopenia, diminuição da função imune, dermatites, queda de cabelo (PETTEI et al., 1991; RAMIREZ & SOKOL, 1994; KELLY, 1995; JEPPESEN et al., 1997) e déficits na acuidade visual (DECSI & KOLETZKO, 1994; YAMASHIRO et al., 1994; CARNIELLI et al., 1996).

1.5.4. Deficiência de vitaminas lipossolúveis

- ***Vitamina A***

A solubilização intraluminal de vitamina A e de outros carotenóides está comprometida pela falta de bile, resultando em má absorção destes nutrientes (RAMIREZ & SOKOL, 1994; SOKOL, 1994). Além disso, nas lesões do parênquima hepático a síntese e a liberação de proteínas ligadoras de retinol podem estar comprometidas. Em conseqüência há prejuízo na liberação de vitamina A das reservas hepáticas e, portanto, suprimento inadequado das necessidades teciduais. Deficiência desta vitamina tem sido observada em 35 a 69% das crianças com doença hepática colestática (RAMIREZ & SOKOL, 1994).

Em geral, sintomas e sinais de deficiência de vitamina A ocorrem quando as concentrações séricas estão entre 10 e 20μg/dL (KAUFMAN et al., 1987; SOKOL, 1994) ou quando a concentração hepática de retinóides é menor que 5 a 10 μg/g de tecido (RAMIREZ & SOKOL, 1994; SOKOL, 1994).

Sua deficiência pode causar cegueira noturna, manchas de Bitot, retinopatia pigmentar, xeroftalmia, ceratomalácia, diminuição da competência imunológica, diminuição da pressão intracraniana, diminuição da velocidade de crescimento (RAMIREZ & SOKOL, 1994; SOKOL, 1994).

- ***Vitamina D***

Crianças com doença hepática colestática apresentam deficiência de vitamina D por má-absorção da vitamina ingerida (D_2 ou ergocalciferol), pois depende do fluxo biliar adequado para solubilização e formação de micelas, e pela exposição reduzida da pele ao sol (deficiência de vitamina D_3 ou colecalciferol), devido ao seu estado debilitado (RAMIREZ & SOKOL, 1994). A ativação da vitamina D_2 ou D_3 pode estar prejudicada na colestase, uma vez que a icterícia pode interferir na sua metabolização pelos raios ultravioleta na pele e a lesão hepática pode prejudicar sua 25-hidroxilação. Além disso, a liberação da proteína transportadora de vitamina D é reduzida, ocasionando baixas concentrações séricas (SOKOL,1994).

A vitamina D participa na homeostase do cálcio e fósforo, permitindo a absorção do cálcio ao nível do intestino e a deposição do cálcio e fósforo nos ossos. As duas alterações que ocorrem na sua deficiência são: 1) mineralização defeituosa do osteóide (raquitismo ou osteomalácia) e 2) formação reduzida de matriz adequadamente mineralizada (osteoporose) (KAUFMAN et al., 1987; DORNAUS & WALCZAK, 1991). Em pacientes colestáticos, a osteoporose é a lesão predominante e, geralmente, não responde à suplementação de vitamina D (SOKOL, 1994).

- ***Vitamina E***

A vitamina E compreende o grupo dos tocoferóis, compostos que atuam como agentes antioxidantes, protegendo componentes celulares da degradação peroxidativa (KAUFMAN et al., 1987).

As manifestações clínicas da deficiência de vitamina E constituem-se por uma síndrome neurológica (SOKOL et al., 1983), caracterizada por degeneração neuromuscular progressiva que pode se manifestar por hiporeflexia, ataxia,

neuropatia periférica, oftalmoplegia e disfunção retinal (RAMIREZ & SOKOL, 1994; SOKOL, 1994; KELLY, 1995), podendo levar a lesões neurológicas irreversíveis.

A carência desta vitamina, na colestase, diminui a capacidade de eliminação de radicais livres o que leva à reação em cadeia da peroxidação lipídica (DAVIT-SPRAUL et al., 2001).

- ***Vitamina K***

A má absorção de vitamina K resulta na diminuição da concentração sérica dos fatores de coagulação II, VII, IX E X e, conseqüentemente, aumento no tempo de protrombina (SOKOL, 1994).

A coagulopatia manifesta-se inicialmente por hematoma e epistaxes, mas pode contribuir para o aparecimento de hemorragias mais graves (RAMIREZ & SOKOL, 1994; SOKOL, 1994; KELLY, 1995).

1.5.5. Acolia ou hipocoia fecal

O organismo humano excreta nas fezes quase que a totalidade dos pigmentos biliares (acima de 260 mg/d) produzidos no intestino por ação das bactérias intestinais sobre a bilirrubina. Uma pequena fração (0 a 4mg/d) é excretada na urina na forma de uribilinogêneo (STOLL, 1982). A ausência ou diminuição desses pigmentos no intestino faz com que as fezes dos pacientes com colestase se apresentem descoradas inteiramente (acolia) ou tenham cor amarela-clara (hipocolia fecal).

1.5.6. Translocação de bactérias e endotoxinas

Ausência dos sais biliares na luz intestinal resulta em atrofia da mucosa intestinal (ASSIMAKOPOULOS et al., 2005) e está associada ao aumento de microorganismos gram-negativos aeróbicos e endotoxemia sistêmica (CAHILL, et al., 1987; REYNOLDS et al., 1995; CLEMENTS et al., 1996).

A translocação bacteriana consiste na passagem de bactérias do intestino para os linfonodos mesentéricos, órgãos distantes (BERG & GARLINGTON 1979)

ou para a cavidade peritoneal. Neste caso, ocorre a peritonite ou a metastatização para outros órgãos, promovendo sepse de origem intestinal (DEITCH et al., 1990). A falência do sistema imunológico contribui para a translocação bacteriana, suprimindo a ativação dos macrófagos (REYNOLDS et al., 1995; CLEMENTS et al., 1996; REYNOLDS et al., 1996).

As endotoxinas absorvidas e não eliminadas pelo fígado contribuem para as alterações hemodinâmicas e renais que podem acompanhar a colestase (SAKISAKA, et al., 1997; SEWNATH et al., 2000).

1.6. CONSEQÜÊNCIAS HEPÁTICAS DA RETENÇÃO DE CONSTITUINTES DA BILE

A morte celular dos hepatócitos na colestase, tanto por necrose quanto por apoptose parece ter como mecanismo principal à retenção de ácidos biliares (GUICCIARDI & GORES, 2002).

1.6.1. Apoptose

A apoptose é um processo patológico que contribui para a renovação celular (BURSCH et al., 1990). A apoptose é raramente reconhecida em secções histológicas em razão do pequeno tamanho das células apoptóticas e pela rapidez com que estas são fagocitadas e digeridas pelas células de Küpffer ou pelos hepatócitos normais (BHATHAL & GALL, 1985; GUICCIARDI & GORES, 2002).

Na colestase, a apoptose dos hepatócitos é desencadeada por ação dos ácidos bilares sobre receptores de morte celular na superfície do hepatócito. Hepatócitos em processo de apoptose aparecem como corpúsculos semelhantes aos corpúsculos de Councilman – as células se apresentam com volume diminuído, citoplasma denso e eosinofílico e os núcleos, picnóticos ou fragmentados (BHATHAL & GALL, 1985).

Durante a colestase os ácidos biliares em concentrações acima das fisiológicas acumulam-se dentro do hepatócito, distribuindo-se nas membranas celulares e alterando a sua permeabilidade. Penetrando nas mitocôndrias, onde

promovem a geração de radicais de oxigênio livres e a conseqüente peroxidação lipídica (PATEL & GORES, 1997).

1.6.2. Necrose

A necrose se acompanha de degeneração hidrópica secundária a alteração na função da membrana citoplasmática, em especial da ATPase dependente de Na^+ e K^+. Esta alteração leva a acúmulo de sódio e água dentro da célula, e por sua vez pode estar relacionada com:

1) Propriedades detergentes – Embora os ácidos biliares se acumulem no fígado durante a colestase é improvável que os níveis observados nesses casos sejam suficientes para que sua atividade detergente lese as membranas celulares. Além disso, sua toxicidade pode ser observada mesmo abaixo da concentração micelar crítica (REICHEN, 1993);

2) Mudanças na homeostase do cálcio intracelular (SPIVEY et al., 1993) – Provavelmente, por sua ação detergente, os ácidos biliares aumentam a permeabilidade das membranas das organelas, especialmente do retículo endoplásmico, liberando para o citosol os íons cálcio. Estes ativam proteases dependentes do cálcio e a quinase da proteína C que atuam como mensageiros secundários para a morte celular (SCHÖLMERICH & STRAUB, 1992);

3) Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (*reative oxigen species* - ROS) - Este aumento e o conseqüente estresse oxidante na colestase é um dos fatores que pode levar a lesão celular (SOKOL et al., 1993; SOKOL et al., 2001). Observações clínicas (LEMONNIER et al., 1987; LUBRANO et al., 1989) e experimentais (SOKOL et al., 1991) indicam que os radicais livres podem resultar da peroxidação lipídica. O conteúdo de gordura da dieta parece influenciar a composição lipídica das frações subcelulares da membrana do hepatócito (KOOLS et al., 1989). Havendo aumento dos ácidos graxos poliinsaturados, os substratos para a peroxidação lipídica estarão aumentados, conseqüentemente, existirá uma propensão aumentada para a peroxidação lipídica, elevação da fosfatase alcalina sérica e aumento da concentração de bilirrubina (SOKOL et al., 1991);

4) Deficiência na cadeia de transporte mitocondrial - Observou-se que os ácidos biliares interferem no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa das mitocôndrias (LEE & WHITEHOUSE , 1965). Estes aumentam a produção de ROS, que pode agravar a lesão mitocondrial, pois lesam proteínas e membranas lipídicas dessas organelas, perturbando sua função e, em especial, interferem com a cadeia de transporte de elétrons com enzimas da matriz mitocondrial e com β oxidação (KRÄHENBÜHL et al., 1994; SOKOL et al., 1995). Os ácidos biliares também liberam ROS agindo sobre os neutrófilos e os macrófagos, que são freqüentemente encontrados no infiltrado inflamatório do trato portal em fígados colestáticos de humanos e de ratos com ligadura do colédoco (SCHEUER , 1980). A produção de radicais livres por macrófagos isolados de fígado de ratos com colestase acompanha o aumento da produção de prostaglandinas E_2, caracterizando uma resposta inflamatória (ADACHI et al., 1992).

1.6.3. Fibrose

Após a lesão hepática de qualquer etiologia, ocorre a ativação das células estreladas (FRIEDMAN, 2000), que são normalmente pouco mitóticas ("quiescentes") e responsáveis pela captação, estoque e liberação de retinóides (CHEN & ZHANG, 2003).

A degeneração hidrópica, mas não a apoptose, atrai células inflamatórias que liberam (SCHUPPAN et al., 2001):

- metaloproteinases que destroem a matriz fibrosa extracelular normal;
- fatores de crescimento e citoquinas.

Os produtos da ruptura das fibras da matriz extracelular normal estimulam a ativação das células de Ito ou células estreladas peri-sinusoidais. Estas assumem o fenotipo de miofibroblastos. Elas são estimuladas pelos fatores de crescimento e citoquinas liberadas pelas células inflamatórias, em particular o fator de crescimento dependente de plaquetas (PDGF- β) (CHEN & ZHANG, 2003) e o fator de crescimento transformante beta (TGF-β) (DAVIS et al., 1991; FRIEDMAN, 2000). Os miofibroblastos ou células de Ito ativadas ou estimuladas depositam as fibrilas da matri extracelular anormal (BLOMHOFF & WAKE, 1991; CHEN & ZHANG, 2003).

A ativação das células de Ito é concomitante à perda de seus lipossomos que contem depósitos de vitamina A. A deficiência desta vitamina facilita essa ativação e, portanto a deposição de fibrose (BLOMHOFF & WAKE, 1991; CHEN & ZHANG, 2003). O suprimento adequado de vitamina A dificulta esse processo.

1.6.4. Proliferação ductal

A proliferação ductal acompanha-se de fibrose, especialmente no modelo de obstrução ductal crônica no rato. Os colangiócitos proliferados devem alterar a matriz fibrosa extracelular e liberar fatores solúveis que ativam as células de Ito. Eles também liberam o TGF-β e o PDGF- β, cujos receptores nas células de Ito ativada estão em maior quantidade (PINZANI & MILANI, 1998). GAUDIO et al. (2005) demonstraram, na colestase experimental, que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) modula a atividade proliferativa dos colangiócitos.

A proliferação ductal pode ser desencadeada por ação dos radicais livres e dos aldeídos derivados da peroxidação lipídica que ativam a proteína ativadora 1; esta estimula a transcrição dos genes do fator TGF-β, do colágeno tipo 1, e as metaloproteinases da matriz colágena normal (MEYER et al., 1993). O peróxido de hidrogênio, na presença de $Ca2^{+}$ inativa o fator inativador do fator nuclear Kappa B (NF-kappaB) (BYUN et al., 2002); este estimula a transcrição do fator de necrose tumoral α (TNF-α). Este estimula a proliferação ductal (LIU, 2005).

1.7. CONSEQÜÊNCIAS SISTÊMICAS DA RETENÇÃO DE CONSTITUINTES DA BILE

1.7.1. Icterícia

A icterícia pode resultar de: 1) superprodução de bilirrubina; 2) prejuizo na captação pelo hepatócito e no transporte da bilirrubina no retículo endoplasmático; 3) distúrbio na conjugação da bilirrubina; 4) obstrução mecânica ou funcional do fluxo da bile (HIGA et al., 2000).

A icterícia (coloração amarelada da conjuntiva ocular, das membranas mucosas e da pele) aparece quando a concentração plasmática de bilirrubina

excede 5mg/dL no recém-nascido e 3mg/dL na criança maior (BERG et al., 1999). Elevação dos níveis séricos de bilirrubina conjugada persistente além dos 14 dias de vida pode indicar colestase neonatal (BALISTRERI, 2000).

1.7.2. Colúria

A retenção de bilirrubina conjugada (BC) leva ao aumento da sua excreção urinária. A excreção de BC é dependente de sua fração no plasma que não é ligada à proteína e, portanto disponível para filtração glomerular. Em condições normais sua fração corresponde a menos de 1% da bilirrubina total no plasma. Devido à sua grande solubilidade na água, o pigmento é filtrado pelo glomérulo renal. Quando a quantidade de BC no filtrado glomerular é superior à capacidade de reabsorção pelo túbulo contornado proximal, ocorre a bilirrubinúria que é característica da icterícia (BERG et al., 1999).

A bilirrubina, por ação das bactérias intestinais se transforma em urobilinogênio e em urobilina. A passagem de urobilinogênio da circulação entero-hepática para a circulação sistêmica pode ocorrer na vigência de excessiva excreção de BC, da alteração da motilidade intestinal e nas doenças hepatocelulares nas quais a excreção de urobilinogênio pode diminuir. Desta forma, o aumento da BC e da urobilina que são excretadas na urina e no suor explicam a presença de colúria (cor amarelo escura da urina) observada nos casos de colestase (BERG et al., 1999).

1.7.3. Prurido

O prurido é um dos sintomas mais desagradáveis da colestase, afetando a qualidade de vida dos pacientes. Os sintomas podem variar de: 1) intensidade leve – não interfere nas atividades normais do paciente; 2) intensidade moderada – distúrbios do sono, com exacerbação dos sintomas à noite e em temperaturas mais quentes e 3) intensidade grave – pode levar ao suicídio, sendo indicação de transplante hepático (MADDREY & THIEL, 1988).

Há longo tempo, o prurido tem sido atribuído à retenção de ácidos biliares no sangue e na pele (SCHMID, 1973; HERNDON, 1972). Evidências mais recentes sugerem que um componente significante do prurido seja de origem

neurogênica central, possivelmente envolvendo o sistema receptor de opióides estimulados por agonistas opióides, o que causa a sensação de prurido (BERGASA & JONES,1993; BERGASA & JONES, 1995). A verdadeira fonte do opióides pruridogênicos não é conhecida. É possível que uma pró-encefalina seja produzida por ductulos proliferados em ratos com ligadura de colédoco (BERGASA et al., 1995). Portanto, os ácidos biliares, retidos no fígado, talvez possa estimular direta ou indiretamente a síntese de opióides agonistas.

1.7.4. Hipercolesterolemia e Xantomas

Elevação do colesterol sérico (>500mg/dL) pode causar lesões decorrentes do depósito de lipídios na derme e tecido subcutâneo, denominadas xantomas (BALISTRERI, 2000). Xantelasmas são xantomas planos ou ligeiramente salientes vistos principalmente ao redor dos olhos, nas palmas das mãos, no pescoço, no peito e nas costas. Xantomas tuberosos aparecem, em fases mais adiantadas da colestase, nas áreas extensoras especialmente no pulso, nos cotovelos, nos tornozelos, nos joelhos e nas nádegas. Ocasionalmente eles podem envolver ossos ou nervos periféricos (SOKOL, 1990).

O risco de aterosclerose foi encontrado em crianças com colestases familiares intra-hepáticas progressivas (NAGASAKA et al., 2005), mas não é conhecido em outras doenças hepáticas colestáticas crônicas. A hipercolesterolemia grave em casos de Síndrome de Alagille foi associada a lipidose renal, o que pode causar insuficiência renal (CHUNG-PARK et al., 1982).

1.7.5. Hipertrigliceridemia

Aumento dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis na doença hepática é geralmente encontrado em LDL de densidade variada. O aparecimento no plasma de LDL remanescente rico em triacilgliceról está associado à diminuição da atividade da H-TGL (lipase triglicéride hepático) (SABESIN et al., 1980).

1.8. MODELOS EXPERIMENTAIS DE COLESTASE

Vários modelos experimentais que simulam colestase humana têm sido muito úteis na elucidação das diferentes etapas da patogênese da colestase (REICHEN & SIMON, 1994).

Várias técnicas para o desenvolvimento de colestase tem sido descritas, sobretudo em ratos, baseada em:

1) obstrução aguda e completa do ducto biliar comum (CAMERON & OAKLEY, 1932);

2) colestase induzidas por endotoxinas (ARRESE et al., 2001);

3) colestase induzida por estinilestradiol (ARRESE et al., 2001);

4) Colestase por Clorpromazina (AKERBOOM et al., 1991);

5) Colestase por Imunodeficiência (COHEN & SIEGEL, 1993);

6) Colestase em Camundongos timectomizados (KOBASHI et al., 1994).

A ligadura e ressecção do ducto biliar comum em rato é o método mais utilizado para o estudo experimental da colestase obstrutiva. Nesse modelo experimental, ocorre proliferação dos ductos biliares em intensidade muito maior do que aquela vista em humanos, fibrose, especialmente em torno dos ductos biliares proliferados, infiltrado inflamatório discreto e formação de cirrose septal parcial, disfunção mitocondrial, interrupção das estruturas da junção firme e redistribuição das proteínas das membranas (BARR & HUBBARD, 1993). Esse modelo também pode ser usado como modelo de alterações do metabolismo de lipídios que ocorre na atresia biliar (De VRIESE et al., 2001).

1.9. TRATAMENTO DIETOTERÁPICO NA COLESTASE

Há longo tempo propõe-se a substituição da gordura com ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) por gordura com ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no tratamento dietético da colestase.

1.9.1. Aspectos nutricionais e metabólicos dos TCM

Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM), ao contrário dos triacilgliceróis de cadeia longa (TCL), são mais rapidamente absorvidos no intestino e entram diretamente na circulação portal, sem necessidade de ácidos biliares (HOLT, 1966; LINSCHEER et al., 1966; SENIOR, 1969; OCKNER et al., 1972; WILLIAMS & DICKSON, 1972; BACH & BABAYAN, 1982). Na completa ausência de sais biliares na luz intestinal apenas 60 a 70% dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) podem ser absorvidos (VLAHCEVIC et al., 1992); enquanto a absorção dos TCM é em torno de 98% (PROTHEROE, 1998).

Assim, a substituição de TCL por TCM reduz significativamente a esteatorréia e melhora o crescimento de crianças com atresia biliar e cirrose secundária (COHEN & GARTNER, 1971; PROTHEROE, 1998).

Em adição, os TCM não necessitam de carnitina para entrarem na mitocôndria, onde são oxidados em corpos cetônicos (fígado) e em ATP (tecidos) (JOHNSON et al., 1990; BACH & BABAYAN, 1982). A biossíntese de carnitina é 52% diminuída na cirrose biliar secundária (KRÄHENBÜHL et al., 2000). Nesse caso, os TCM podem ser melhor utilizados como fonte de energia.

O valor energético fornecido pelos TCM é 8,3 kcal/g (quilocaloria por grama) (SENIOR, 1969; ALPERS *et al.*, 1983), sendo utilizado na prática o valor de 7 kcal/g considerando uma ω-oxidação em torno de 20% que, dessa forma, inutiliza parte dos mesmos (ALPERS *et al.*, 1983).

1.9.2. Fontes, preparação e propriedades dos TCM

Os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são encontrados em vários óleos e gorduras, tais como coco, palmiste e babaçu (BABAYAN, 1968). A gordura de coco é obtida da amêndoa parcialmente seca (copra) do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* Linnaeus). A gordura de palmiste é obtida da amêndoa do fruto da palmeira de dendém (*Elaeis guineensis* Jacq). O óleo de babaçu é obtido da amêndoa do fruto de diversas espécies de palmeira do gênero *Orbignya* (MADRP, 2005).

Quadro 2 - Composição de ácidos graxos (g/100g) das gorduras fontes de TCM.

Ácido graxo	Nomenclatura	COCO	PALMISTE	BABAÇU
C 6:0	CAPRÓICO	ND – 0,7	ND – 0,8	ND
C 8:0	CAPRÍLICO	4,6 – 10,0	2,4 – 6,2	2,6 – 7,3
C 10:0	CÁPRICO	5,0 – 8,0	2,6 – 5,0	1,2 – 7,6
C 12:0	LÁURICO	45,1 – 53,2	45,0 – 55,0	40,0 – 55,0
C 14:0	MIRÍSTICO	16,8 – 21,0	14,0 – 18,0	11,0 – 27,0
C 16:0	PALMÍTICO	7,5 – 10,2	6,5 – 10,0	5,2 – 11,0
C 18:0	ESTEÁRICO	2,0 – 4,0	1,0 – 3,0	1,8 – 7,4
C 18:1	OLÉICO	5,0 – 10,0	12,0 – 19,0	9,0 – 20,0
C 18:2	LINOLÉICO	1,0 – 2,5	1,0 – 3,5	1,4 – 6,6
C 18:3	α-LINOLÊNICO	ND – 0,2	ND – 0,2	ND
C 20:0	ARAQUÍDICO	ND – 0,2	ND – 0,2	ND
C 20:1	EICOSAENÓICO	ND – 0,2	ND – 0,2	ND
C 22:0	BEÊNICO	ND	ND	ND

ND – não detectável

Fonte: MADRP, 2005.

As misturas desses óleos são usadas como ponto de partida para a manufatura dos TCM purificados para fim comercial. Eles são produzidos por hidrólise seguida de fracionamento e destilação, sendo obtidos predominantemente ácidos graxos saturados com oito carbonos (C8:0 – caprílico) e com dez carbonos (C10:0 – cáprico) e traços C6:0 (capróico) e C12:0 (láurico), posteriormente são reesterificados com o glicerol formando TCM (BABAYAN, 1968; SENIOR, 1969; BACH & BABAYAN, 1982).

Os TCM têm menor peso molecular e são mais solúveis em água do que os TCL, o que facilita a ação da lipase pancreática (BACH & BABAYAN, 1982).

1.9.3. Estudos experimentais com diferentes dietas

DEEMS & FRIEDMAN (1988), observaram que animais com ligadura do ducto biliar comum, alimentados com uma dieta contendo óleo de coco como fonte de gordura, tiveram ganho de peso significativamente maior do que animais

alimentados com uma dieta composta de gordura contendo ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, a mortalidade foi 44% nos animais alimentados com gordura de cadeia longa e 0% naqueles alimentados com gordura de cadeia média.

CARAMORI (2000), em trabalho realizado neste laboratório, mostrou que a gordura de coco (que contêm 52,4% de TCL e 47,6% de TCM) é melhor absorvida por ratos jovens com obstrução biliar do que o TCM purificado preparado comercialmente. Além disso, houve melhora nos parâmetros da curva de crescimento dos animais, sem diferença na intensidade da lesão hepática.

Entretanto, DEEMS et al. (1993), tinham mostrado que animais colestáticos alimentados com dieta rica em gordura (30% das calorias fornecidas por óleo de açafroa) apresentaram, 28 dias após a ligadura do ducto biliar comum, maiores níveis de atividade da fosfatase alcalina, mais fibrose e proliferação ductal no fígado do que animais que receberam uma dieta pobre em gordura (3% das calorias totais). Da mesma forma, MURIEL (1995), observou que animais que receberam ração comercial enriquecida com gordura de porco (33% do total de calorias) apresentaram maior dano hepático comparados aos animais que receberam a mesma ração com baixo teor de gordura (4,5% das calorias fornecidas).

Comparamos em nosso trabalho anterior (SANTOS, 2002) dieta contendo gordura de coco de babaçu em alta concentração com dieta contendo óleo de milho baixa concentração. Nesse trabalho, pudemos demonstrar que a dieta com baixo teor de óleo de milho atenua os efeitos da colestase sobre o retardo de crescimento e a retenção de água, proporciona melhor aproveitamento das calorias e da proteína da dieta, mesmo comparada à gordura de coco de babaçu.

Tendo em vista o exposto, propomos testar se o emprego da gordura de coco de babaçu difere ou não quanto aos efeitos sobre o metabolismo lipídico e sobre as lesões hepáticas da cirrose biliar secundária quando comparados com dieta contendo óleo de milho em baixas concentrações.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Testar num modelo experimental de cirrose biliar secundária em ratos jovens as seguintes hipóteses:

1. Uma dieta com óleo de milho em baixa concentração tem efeito diferente de uma dieta com gordura de coco de babaçu sobre os seguintes aspectos:
   - metabolismo lipídico;
   - função hepática;
   - lesão hepática.

2. Há correlação entre as lesões hepáticas, tomadas duas a duas, em uma dieta com óleo de milho em baixa concentração e em uma dieta com gordura de coco de babaçu.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1ª Hipótese: Uma dieta com óleo de milho em baixa concentração tem efeito diferente de uma dieta com gordura de coco de babaçu sobre o metabolismo lipídico, a função e a lesão hepática na cirrose biliar secundária.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES

- Presença ou não de colestase (operação simulada ou ligadura com ressecção do ducto biliar comum)
- Tipo de ração (contendo triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa em baixa concentração ou gordura de coco de babaçu)

VARIÁVEIS DEPENDENTES

Metabolismo lipídico

- Concentrações séricas de: colesterol total (CT) e frações – lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c); triacilgliceróis (TG) e vitamina A

Função hepática

- Tempo de sono induzido pelo pentobarbital
- Concentração sérica de albumina

Lesão hepática

- Atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT)
- Concentração sérica de globulinas
- Peso fresco, conteúdo de água e de gordura do fígado e do baço
- Alterações histológicas (fibrose portal, proliferação ductal, fibrose pericelular, esteatose, degeneração hidrópica, necrose e mitoses)

2ª Hipótese: Há correlação entre as lesões hepáticas, tomadas duas a duas, na cirrose biliar secundária com dieta contendo óleo de milho em baixa concentração e com dieta com gordura de coco de babaçu.

VARIÁVEIS

- Alterações histológicas (fibrose portal, proliferação ductal, fibrose pericelular, esteatose, degeneração hidrópica, necrose e mitoses)

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estudados 40 ratos* machos da raça *Wistar*, nascidos no Laboratório Experimental de Pediatria de fêmeas nulíparas, pesando 180 a 220g no início da gestação, fornecidas pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – Unesp. No 21º dia pós-natal (P21), cada animal foi destinado, aleatoriamente, a um dos QUATRO grupos experimentais:

Grupo LSG – Ligadura e ressecção do ducto biliar comum e ração contendo triacilgliceróis de cadeia longa como fonte lipídica, em baixa concentração calórica (dieta SG);

Grupo LGC – Ligadura e ressecção do ducto biliar comum e ração contendo gordura de coco de babaçu como fonte lipídica (dieta GC);

Grupo SSG – Operação simulada e dieta SG;

Grupo SGC – Operação simulada e dieta GC.

3.3. FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO

Para elaboração das rações, foram adotadas as seguintes premissas:

- Compor as duas dietas de forma que sejam isocalóricas (com o mesmo conteúdo calórico total por 100g de ração), levando em consideração a quantidade de TCL não aproveitada na colestase (40%);

---

* Por motivos técnicos os dados de um animal foram perdidos e, portanto, um grupo experimental foi concluído com 9 animais.

▪ Oferecer aos grupos LSG e SSG ração contendo óleo de milho em proporção que forneça 4,5% do total de calorias;

▪ Oferecer aos grupos LGC e SGC ração contendo gordura de coco de babaçu em proporção que forneça 32,7% do total de calorias.

GORDURA DE COCO DE BABAÇU

▪ A gordura de coco de babaçu foi adquirida na forma refinada e sua composição está relacionada no Quadro 3.

Quadro 3: COMPOSIÇÃO DA GORDURA DE COCO BRASIL (Refino de Óleos Brasil (ROB) – Compania Leco de Produtos Alimentícios®).

TRIACILGLICERÓL	ESTRUTURA	QUANTIDADE EM g/100g	
ÁC. CAPRÍLICO	C 8:0	2,4	TCM 47,6%
ÁC. CÁPRICO	C 10:0	2,8	
ÁC. LÁURICO	C 12:0	42,4	
ÁC. MIRÍSTICO	C 14:0	16,5	TCL 52,4%
ÁC. PALMÍTICO	C 16:0	9,9	
ÁC. ESTEÁRICO	C 18:0	2,9	
ÁC. OLÉICO	C 18:1	19,0	
ÁC. LINOLÉICO *	C 18:2	3,6	
ÁC. α-LINOLÊNICO *	C 18:3	0,1	
ÁC. ARAQUÍDICO	C 20:0	0,2	
ÁC. EICOSAENÓICO	C 20:1	0,1	
ÁC. BEÊNICO	C 22:0	0,1	

∗ AGE – Ácidos graxos essenciais

ÓLEO DE MILHO

- Óleo de milho é composto por TCL e, segundo o Departamento de Agricultura dos EUA (USA – DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1986), contém ácido linoléico (ácido graxo essencial) na concentração aproximada de 34g por 100g de óleo (Quadro 4) e seu valor calórico é 8,84 kcal/g.

Quadro 4: CONTEÚDO DE TRIACILGLICERÓIS DE CADEIA MÉDIA (TCM), TRIACILGLICERÓIS DE CADEIA LONGA (TCL) E ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS (AGE) EM GRAMAS POR 100G DE GORDURA.

Elemento	Óleo de Milho	Gordura de coco de babaçu
TCM	0	47,6
TCL	100	52,4
AGE	34	3,7

3.3.1. Composição das rações

- As formulações das rações são apresentadas nos Quadros 5, 6 e 7.

Quadro 5: COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES UTILIZADAS NO TRABALHO (valores em grama por 100 gramas de ração).

	Dieta SG	Dieta GC
Proteína (caseína)	12	12
Sacarose (açúcar)	10	10
Amido de milho	67	43
Óleo de milho	1,9	0,75
Gordura de coco de babaçu	–	16,25
Fibra (celulose)	4	12,9
Mistura salina (a)	4	4
Mistura vitamínica (b)	1	1
Benzoato de sódio	0,1	0,1

Quadro 6: DISTRIBUIÇÃO DE CALORIAS FORNECIDAS EM 100g DE CADA RAÇÃO (Kcal).

Unidade	Dieta SG	Dieta GC
Calorias provenientes de proteína	48 (12,9%)	48 (12,1%)
Calorias provenientes de carboidrato	308 (82,6%)	212 (53,5%)
Calorias provenientes de lipídios	16,8 (4,5%)	136,1 (34,4%)
Calorias provenientes da gordura de coco	–	129,5 (32,7%)
Calorias provenientes de TCM	–	54,1
Calorias totais da ração	372,8	396,1
Calorias aproveitáveis	**366,1**	**363,3**

Quadro 7: QUANTIDADE DE AGE (g) FORNECIDA EM CADA DIETA.

	Dieta SG	Dieta GC
AGE Totais	0,65	0,85
AGE Aproveitáveis	0,4	0,5

(***a*** no Quadro 5): MISTURA SALINA

SAL	% NA COMPOSIÇÃO
FOSFATO TRICÁLCIO	43,300
CARBONATO DE CÁLCIO	16,600
FOSFATO DE SÓDIO DIBÁSICO	11,600
CLORETO DE POTÁSSIO	11,300
CLORETO DE SÓDIO	6,600
SULFATO DE MAGNÉSIO	5,000
SULFATO DE MANGANÊS	0,417
CITRATO FÉRRICO	0,333
CARBONATO DE ZINCO	0,217
SULFATO DE COBRE	0,017
IODETO DE POTÁSSIO	0,017

(FOX & BRIGGS, 1960; LAJOLO et al., 1969)

(***b*** no Quadro 5): MISTURA VITAMÍNICA

VITAMINA	**Quantidade em 1000g**
COLINA	200g
ÁCIDO ASCÓRBICO	100g
ÁCIDO PARA AMINO BENZÓICO - PABA	10g
NIACINA	5g
VITAMINA E	5g
VITAMINA K	2g
PANTOTENATO DE CÁLCIO	2g
TIAMINA	0,5g
RIBOFLAVINA	0,5g
VITAMINA B6	0,5g
ÁCIDO FÓLICO	0,2g
RETINOL	0,15g
BIOTINA	0,03g
VITAMINA B12	3mg
ERGOCALCIFEROL	1,25mg
SACAROSE qsp	1000g

(LAJOLO et al., 1969)

▪ As dietas foram calculadas a partir das recomendações para o uso em animais de experimentação quanto a concentração de proteína (12g/100g de ração) e de ácido linoléico (≥ 0,3g/100g de ração) (CCAC, 1984).

▪ A proporção de gordura em cada dieta foi calculada de forma que as calorias disponíveis após a absorção fossem semelhantes (Quadro 6) – considerou-se que 60% dos TCL (VLAHCEVIC et al., 1992) e que 100% dos TCM (PROTHEROE, 1998) sejam absorvidos na ausência de ácidos biliares.

▪ A quantidade de óleo de milho proposta para a dieta SG (4,5%) fornece 0,65g de AGE/100g de ração que corresponde a 0,4g de AGE aproveitáveis (considerando que 40% de TCL não é aproveitado na colestase), portanto, está dentro das recomendações para ácido linoléico (Quadro 7).

▪ A quantidade de gordura de coco de babaçu contida na dieta GC fornece 0,6g de AGE/100g de ração o que corresponde 0,36g de AGE aproveitáveis. Para que essa dieta não tivesse menor quantidade de AGE do que a dieta SG, calculamos a quantidade de óleo de milho a ser suplementado em 0,75g/100g de ração (Quadro 5). Dessa forma, levando em conta a porcentagem perdida pela colestase, a quantidade de AGE aproveitáveis contida na dieta GC é 0,5g/100g (Quadro 7).

▪ Como a quantidade de lipídios da dieta SG é reduzida, a quantidade de calorias foi suplementada por amido (Quadro 5).

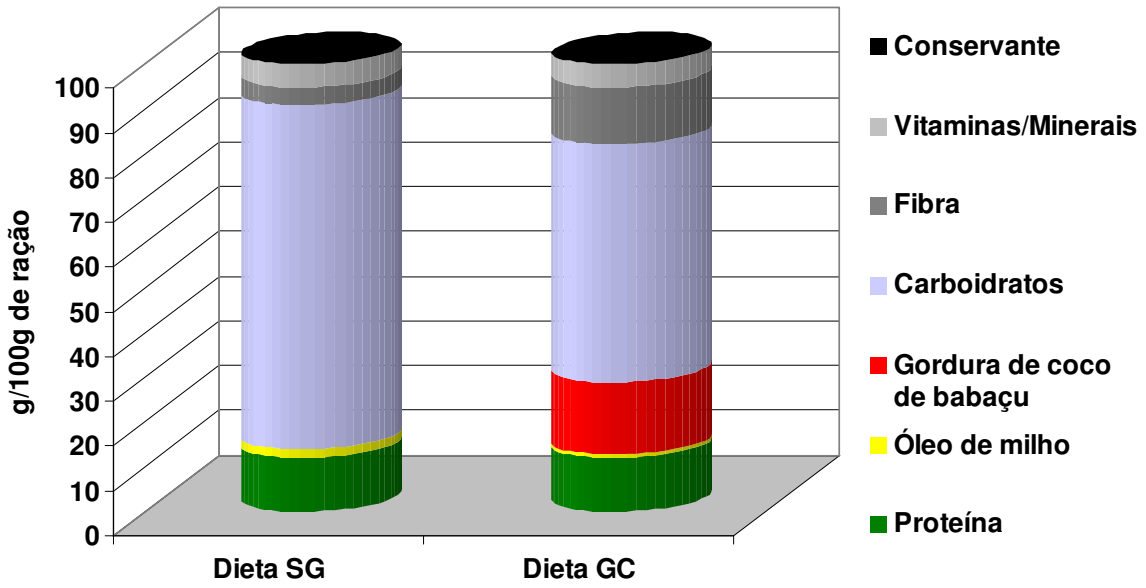

Gráfico 1 – Composição das rações utilizadas no experimento (ver Quadro 5).

3.4. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.4.1. Ligadura e ressecção do ducto biliar comum

A ligadura e ressecção do ducto biliar comum foi realizada de acordo com a técnica adaptada pelo grupo de Hepatologia do Departamento de Pediatria da UNESP (BATTOCHIO et al., 2004), que consiste nos mesmos princípios descritos por CAMERON & OAKLEY (1932) com modificações. A técnica adaptada está apresentada no Quadro 8 e Figura 1.

Quadro 8 – Descrição da técnica cirúrgica adaptada.

I. Manejo do animal, noções de bioterismo, técnica anestésica.
Ia. Peso do animal utilizando-se a balança digital Mettler Toledo (modelo PB 3002, peso máximo = 3,100 g, peso mínimo = 0,5 g, sensibilidade de 0,1 g).
Ib. Anestesia intraperitonial com pentobarbital na dose de 30mg/kg (concentração de 3g/100ml de solução e administração de 0,001ml/peso do animal).
Ic. Posicionamento dos animais em decúbito dorsal horizontal na mesa operatória.
II. Técnica da abordagem abdominal.
IIa. Tricotomia da parede abdominal anterior.
IIb. Incisão da pele na linha mediana de aproximadamente 1 cm (foto A).
IIc. Exposição das camadas musculares e a linha Alba.
IId. Incisão da linha Alba do mesmo tamanho da abertura da pele.
IIe. Abertura do peritônio com tesoura reta sem a exposição dos órgãos abdominais, seguindo diretamente para a exposição do ducto biliar comum com abaixamento do duodeno, a partir da localização do fígado (foto B).
III. Abordagem, dissecção e ressecção do ducto biliar.
IIIa. Dissecção do ducto biliar comum desde abaixo da entrada do último ducto biliar até sua porção distal, próxima ao duodeno.
IIIb. Dupla ligadura do ducto biliar comum, sendo colocadas as ligaduras o mais proximal e o mais distalmente possível (foto C).
IIIc. Ressecção da porção do ducto biliar comum entre as duas ligaduras (foto D).
IIId. Fechamento da parede abdominal com sutura contínua.

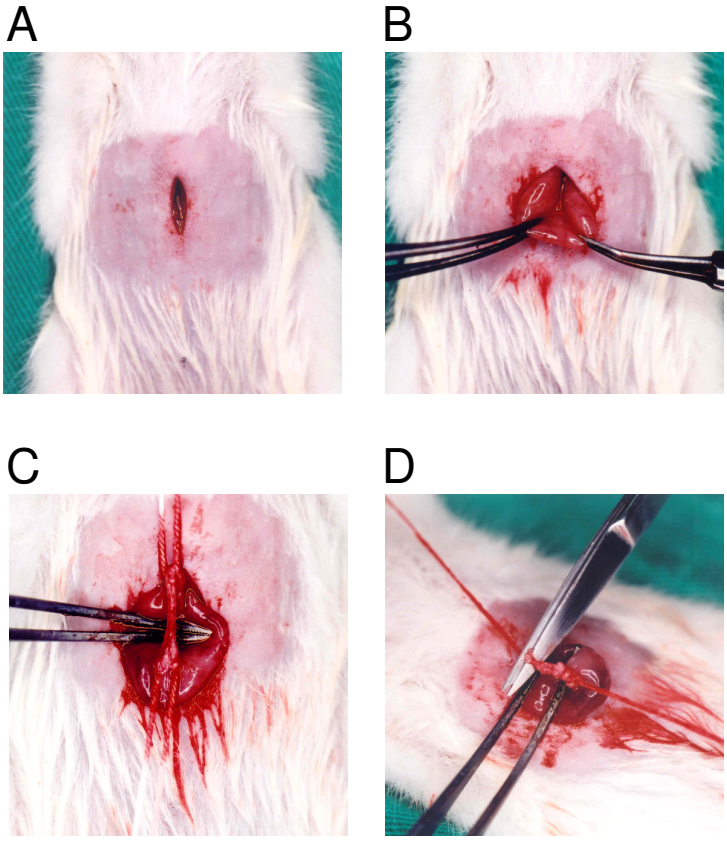

Figura 1 – Demonstração do procedimento cirúrgico da ligadura e ressecção do ducto biliar comum realizado segundo a técnica adaptada.

3.4.2. Operação simulada

A operação simulada seguiu exatamente a mesma metodologia descrita anteriormente, com exceção da ligadura e ressecção do ducto biliar comum (anestesia, laparotomia, manipulação do ducto biliar comum, seguida por passagem dos dois fios, sem efetuar a ligadura).

3.5. EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp, protocolo n° 060, 27/09/1999, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os cuidados com manutenção dos animais, procedimento anestésico, cirurgia e sacrifício foram executados segundo

recomendações contidas no guia do *Canadian Council of Animal Care* (CCAC, 1984) e no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – USA, 1996).

3.5.1. Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As fêmeas nulíparas, com 180 a 220g, fornecidas pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP, foram acasaladas no biotério do Laboratório Experimental da Pediatria. Para o acasalamento, as ratas foram distribuídas duas a duas em gaiolas de polietileno, onde ao final da tarde foi colocado um rato macho. Os animais permaneceram juntos durante toda a noite. Na manhã subseqüente, os machos foram separados das fêmeas e foi realizada a coleta do material vaginal das ratas. Os fatores indicativos de prenhez foi a presença de espermatozóides e o diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Assim, este dia foi considerado como o dia 0 (zero) da gestação.

Estes procedimentos foram repetidos até que o número desejado fosse alcançado.

3.5.2. Cuidados e manutenção dos animais

Todos os animais, desde o nascimento até a ligadura ou operação simulada (item 3.4), até o P21, foram amamentados pela própria mãe em grupos de 6. Enquanto eram amamentados, não tinham acesso à dieta fornecida para a mãe, pois as gaiolas tinham o fundo com grade, impedindo-os de comerem restos de ração, e a ração ficava no alto da gaiola, inacessível aos ratos pequenos. Foram mantidos em condições ambientais controladas – a temperatura foi mantida em torno de 22 a 23ºC e a luz em ciclos de 12 horas alternando entre claro e escuro. Após o desmame, feito no P21, até a eutanásia, foram mantidos em gaiolas individuais, com acesso *ad libitum* a água e a ração padronizada conforme a distribuição pelos grupos.

3.5.3. Eutanásia

A eutanásia foi realizada no P49, após anestesia intraperitonial com pentobarbital, por exsanguinação através de punção cardíaca.

3.6. OBSERVAÇÕES E MEDIDAS

3.6.1. Tempo de sono pelo pentobarbital

O teste do tempo de sono foi realizado no P48, por injeção intraperitonial com pentobarbital na dose de 50mg/kg (concentração de 3g/100ml de solução e administração de 0,0017ml/peso do animal). Foi medido o tempo, em minutos, desde a perda do reflexo de posição até a recuperação do mesmo.

3.6.2. Análise dos órgãos

Foi observado durante a eutanásia a presença de recanalização das vias biliares operadas. Os animais que apresentaram esse aspecto foram desprezados.

O peso do fígado e do baço foi determinado em balança analítica Mettller (modelo h35; d=0,1g; peso máximo=160g). Após pesagem, foi retirado um fragmento longitudinal do lobo direito do fígado para análise histológica (ver item 3.6.4). Foi determinado o peso do fígado e do baço relativo ao peso do animal (g/100g de peso do animal) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo do órgão} = \frac{\text{Peso do órgão x 100}}{\text{Peso do animal}}$$

O conteúdo de água e de gordura do fígado e do baço foram determinados por métodos gravimétricos, descritos a seguir.

- ***Conteúdo de água dos órgãos:***

1) determinação do peso fresco dos órgãos (após retirada do fragmento para análise histológica) em balança analítica Mettller;
2) desidratação em estufa a 100° C por 48 horas;
3) determinação do peso seco na mesma balança utilizada para determinar o peso fresco;
4) cálculo do teor de água do tecido fresco (g/100g de peso do órgão);
5) cálculo do conteúdo de água em g/100g de peso do animal.

$$\text{Teor de água} = \frac{(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) \times 100}{\text{Peso fresco}}$$

$$\text{Conteúdo de água} = \frac{\text{Teor de água} \times \text{Peso do órgão}}{\text{Peso do animal}}$$

- ***Conteúdo de gordura dos órgãos:***

1) pesagem do material desidratado obtido como descrito acima;
2) extração da gordura do material envolto em papel de filtro por éter sulfúrico no extrator de Soxhlet por um período de 12 horas;
3) evaporação do material em ar ambiente por um período de 24 horas;
4) nova passagem em estufa a 100ºC por 1 hora;
5) pesagem do material sem gordura;
6) cálculo do teor de gordura do tecido fresco (g/100g de peso do órgão);
7) cálculo do conteúdo de gordura em g/100g de peso do animal.

$$\text{Teor de gordura} = \frac{(\text{Peso seco} - \text{Peso seco sem gordura}) \times 100}{\text{Peso fresco}}$$

$$\text{Conteúdo de gordura} = \frac{\text{Teor de gordura} \times \text{Peso do órgão}}{\text{Peso do animal}}$$

3.6.3. Exames Bioquímicos

A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, com separação do soro por centrifugação, que foi conservado congelado a –20ºC até a realização das análises.

As atividades séricas de AST e ALT foram determinadas por método de absorção de raios Ultra Violetas (UV) otimizado, no aparelho Technicon®, modelo RAXT, e os valores foram expressos em unidades internacionais por litro (UI/L).

As dosagens de albumina, globulinas, colesterol total, triacilgliceróis e HDL foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico, por automação, no aparelho Technicon®, modelo RAXT. Os valores foram expressos em gramas por decilitro (g/dL).

Os valores de VLDL e LDL foram obtidos por meio de cálculos a partir dos resultados encontrados para triacilgliceróis, colesterol total e HDL. Através das seguintes fórmulas:

$$VLDL = \frac{\text{Triacilgliceróis}}{5}$$

$$LDL = \text{Colesterol total} - HDL - VLDL$$

A dosagem da concentração de vitamina A no soro foi realizada pela técnica de Bessey-Lowry.

3.6.4. Análise Histológica

Um fragmento longitudinal de 0,3 a 0,5cm de espessura do lobo direito do fígado de cada animal foi fixado em solução de formol em salina a 10% v/v por 48 horas, a seguir imerso em álcool a 70% por 24 horas. As lâminas histológicas foram preparadas pelos métodos de rotina do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp. As secções de 0,4 a 0,5µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e pelo método tricrômico de Masson.

A análise histológica foi realizada pelo método semiquantitativo e às intensidades de fibrose, proliferação ductal, fibrose pericelular, esteatose e degeneração hidrópica foi atribuído, para cada animal, um escore de 0 a 3. Foram contadas as áreas de necrose em todo o corte e o número de mitose foi contado em dez campos com grande aumento, tomados aleatoriamente. Foram realizadas duas medidas independentes de cada uma das variáveis histológicas acima. A concordância entre os escores atribuídos às variáveis histológicas pelos dois examinadores foi testada aplicando-se o teste Kappa.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis relacionadas aos exames bioquímicos, análise dos órgãos e para o teste do sono foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (valores extremos, amplitude de variação, distância interquartís, desvio padrão e coeficiente de variação) de cada grupo experimental. Os valores das variáveis de cada grupo experimental foram comparadas entre si, utilizando o programa SAS System 8.02, seguindo as etapas apresentadas a seguir.

1) Verificação da normalidade e da igualdade de variâncias dos valores obtidos para cada grupo.
2) Se houvesse normalidade e da igualdade de variâncias, foi aplicada análise de variância para dois fatores, sendo: fator 1) tipo de ração; fator 2) presença ou ausência de colestase. Esse teste considera as diferenças associadas a cada fator, independentemente do efeito do outro, bem como a interação dos dois fatores.
3) Comparações múltiplas pareadas foram realizadas pelo teste t.
4) Se a amostra não preenchesse os critério do item 1, foram feitas transformações matemáticas nos dados e escolhida aquela que apresentasse igualdade de variâncias, e aplicado os testes mencionados nos itens 2 e 3.

Às variáveis histológicas foi aplicado o teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto) e para comparação múltipla pareada entre os grupos.

A correlação entre as variáveis histológicas duas a duas para os grupos LSG e LGC foi analisada pelo teste de Spearman. Correlação positiva indica que as lesões variam no mesmo sentido e correlação negativa indica que as lesões variam em sentido inverso.

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cuja probabilidade do erro α foi menor que 0,05.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados das análises estatísticas para as variáveis estudadas estão na seguinte ordem:

- Colesterol total – *tabela 1 e figuras 2 e 3*
- Lipoproteína de alta densidade (HDL-c) – *tabela 2 e figuras 4 e 5*
- Lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) – tabela 3 e figuras 6 e 7
- Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) – tabela 4 e figuras 8 e 9
- Triacilgliceróis – tabela 5 e figuras 10 e 11
- Vitamina A – tabela 6 e figuras 12 e 13
- Tempo de sono – tabela 7 e figuras 14 e 15
- Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) – tabela 8 e figuras 16 e 17
- Atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) – tabela 9 e figuras 18 e 19
- Albumina sérica – tabela 10 e figuras 20 e 21
- Globulinas séricas – tabela 11 e figuras 22 e 23
- Composição do fígado (peso do órgão por 100g de peso do animal, conteúdo de água e de gordura) – *tabelas de 12 a 14 e figuras de 24 a 29*
- Composição do baço (peso do órgão por 100g de peso do animal, conteúdo de água e de gordura) – *tabelas de 15 a 17 e figuras de 30 a 35*
- Alterações histológicas – tabelas de 18 a 24 e figuras de 36 a 49
- Correlação entre as lesões hepáticas no grupo LSG – tabela 25 e figura 50
- Correlação entre as lesões hepáticas no grupo LGC – tabela 26 e figura 51

Tabela 1: NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL (CT) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	68,5	90,0	97,5	167,0
Máximo (g/dL)	94	145	151	262
Mínimo (g/dL)	57	49	75	93
AV (g/dL)	37	96	76	169
DI (g/dL)	13,0	28,0	22,0	70,75
Média (g/dL)	71,20	93,20	102,40	168,22
DP (g/dL)	10,63	27,17	22,93	59,01
CV (%)	14,93	29,15	22,39	35,08

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) $p = 0,001$ ∴ ***significativa***

Interação $p = 0,6$ ∴ *não significativa*

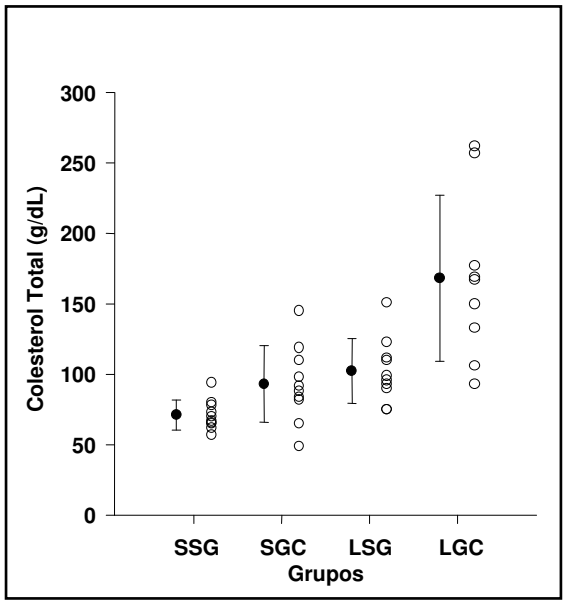

Figura 2 – COLESTEROL TOTAL – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

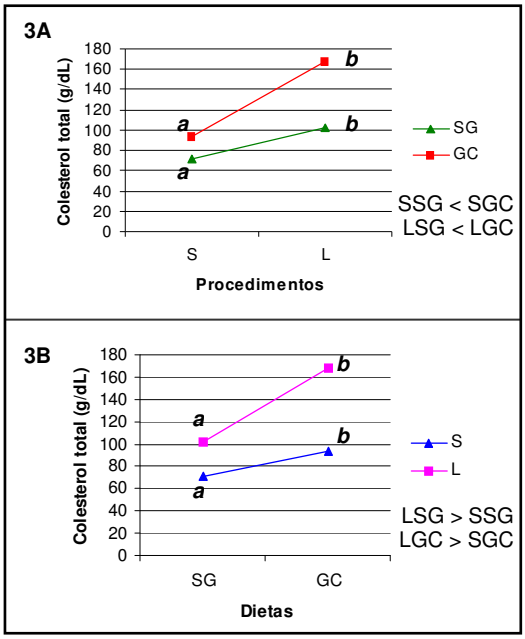

Figura 3 – COLESTEROL TOTAL – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (3A) e dietas (3B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior CT, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. A dieta GC aumentou o CT, tanto na ausência de colestase como nos animais com colestase.

Tabela 2: NÍVEIS SÉRICOS DE HDL-c – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	31,0	42,5	33,0	37,0
Máximo (g/dL)	61,0	56,0	42,0	61,0
Mínimo (g/dL)	19,0	22,0	18,0	25,0
AV (g/dL)	42,0	34,0	24,0	36,0
DI (g/dL)	11,0	8,0	8,0	17,25
Média (g/dL)	33,7	40,1	31,7	41,33
DP (g/dL)	12,44	10,53	6,95	11,72
CV (%)	36,91	26,25	21,91	28,34

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados passaram testes de normalidade e igualdade de variâncias.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) ≈ (SSG + SGC) p = 0,85 ∴ *não significativa*

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) p = 0,02 ∴ ***significativa***

Interação p = 0,64 ∴ *não significativa*

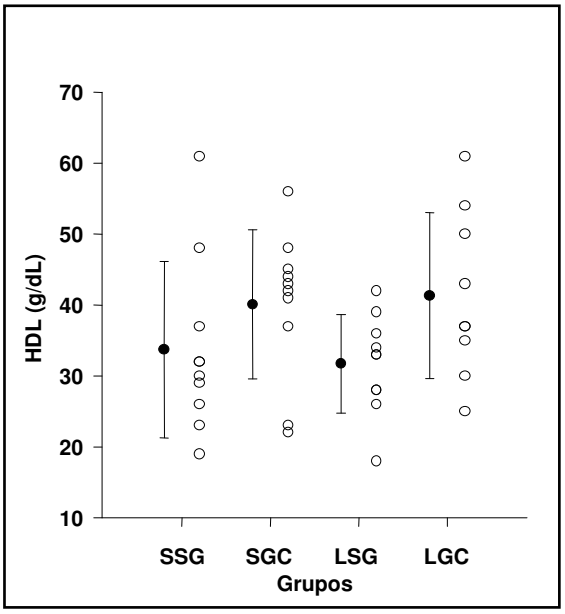

Figura 4 – HDL-c – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

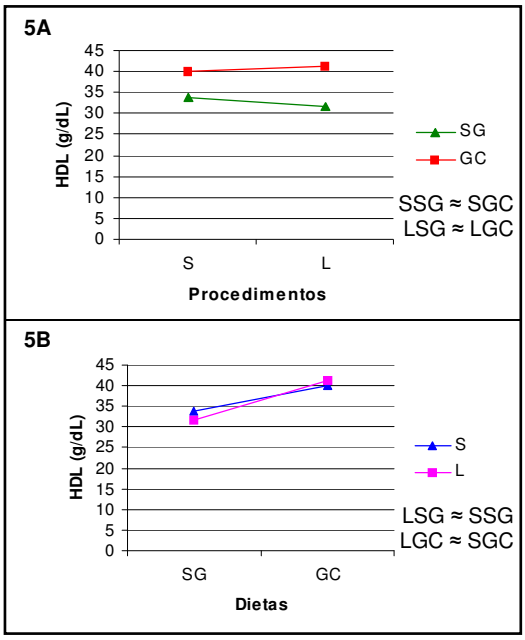

Figura 5 – HDL-c – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (5A) e dietas (5B).

Conclusões: Não pudemos demonstrar diferença estatisticamente significativa quanto a presença ou não de colestase, independentemente da dieta. A dieta SG associou-se a menor HDL-c, independentemente da presença ou não de colestase. Não houve interação entre presença ou não de colestase e tipo de dieta.

Tabela 3: NÍVEIS SÉRICOS DE LDL-c – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	26,2	37,0	46,7	70,2
Máximo (g/dL)	49,2	83,0	68,0	168,4
Mínimo (g/dL)	4,4	1,4	24,4	3,4
AV (g/dL)	44,8	81,6	43,6	165,0
DI (g/dL)	19,0	21,75	29,8	61,75
Média (g/dL)	26,10	35,62	47,54	71,31
DP (g/dL)	14,40	22,42	16,29	49,21
CV (%)	55,18	62,94	34,26	69,01

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,005 ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) p = 0,2 ∴ *não significativa*

Interação p = 0,8∴ *não significativa*

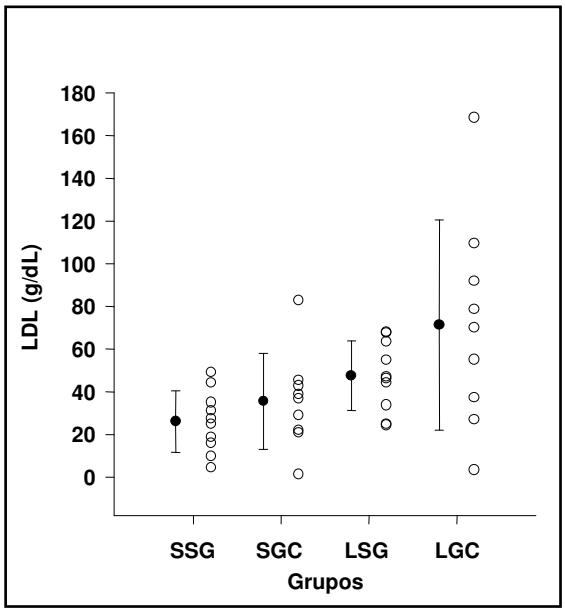

Figura 6 – LDL-c – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

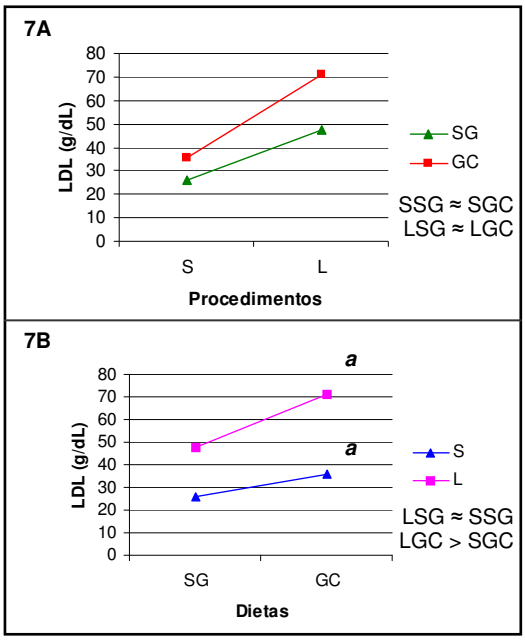

Figura 7 – LDL-c – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (7A) e dietas (7B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase, nos animais com dieta GC, associou-se a maior LDL-c, mas não houve diferença significativa entre os animais com dieta SG. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 4: NÍVEIS SÉRICOS DE VLDL-c – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	7,7	24,8	15,3	56,6
Máximo (g/dL)	34,0	57,4	62,0	105,0
Mínimo (g/dL)	3,6	1,4	9,2	11,0
AV (g/dL)	30,4	56,0	52,8	94,0
DI (g/dL)	6,8	20,8	21,2	66,9
Média (g/dL)	11,40	22,48	23,16	55,58
DP (g/dL)	9,27	16,48	16,60	36,30
CV (%)	81,35	73,33	71,69	65,32

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,003 ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) p = 0,027 ∴ ***significativa***

Interação p = 0,58 ∴ *não significativa*

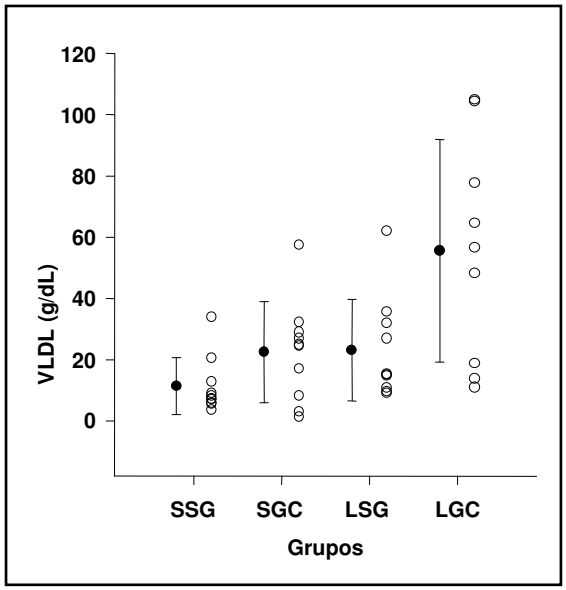

Figura 8 – VLDL-c – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

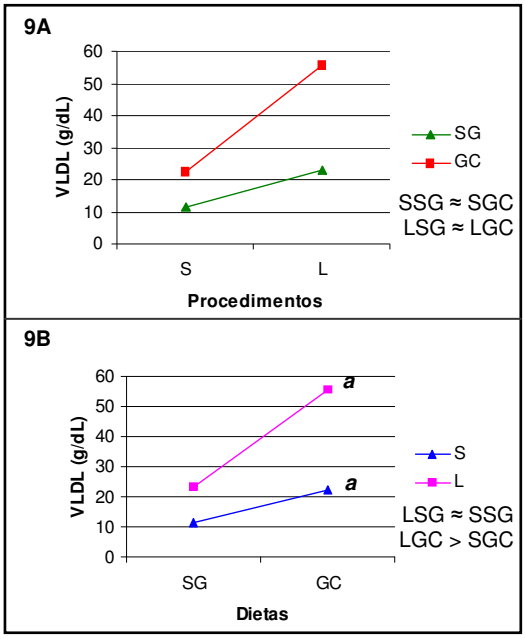

Figura 9 – VLDL-c – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (9A) e dietas (9B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase, nos animais com dieta GC, associou-se a maior VLDL-c, mas não houve diferença significativa entre os animais com dieta SG. A dieta SG associou-se a menor VLDL-c, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 5: NÍVEIS SÉRICOS DE TRIACILGLICERÓIS (TG) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	38,5	124,0	76,5	283,0
Máximo (g/dL)	170	287	310	525
Mínimo (g/dL)	18	7	46	55
AV (g/dL)	152	280	264	470
DI (g/dL)	34,0	104,0	106,0	334,5
Média (g/dL)	57,00	112,40	115,80	277,89
DP (g/dL)	46,37	82,42	83,02	181,50
CV (%)	81,35	73,33	71,69	65,32

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,003 ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) p = 0,027 ∴ ***significativa***

Interação p = 0,58 ∴ *não significativa*

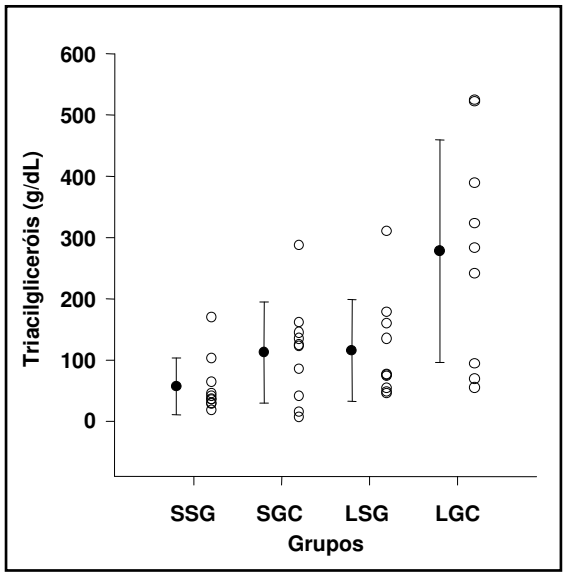

Figura 10 – TG – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

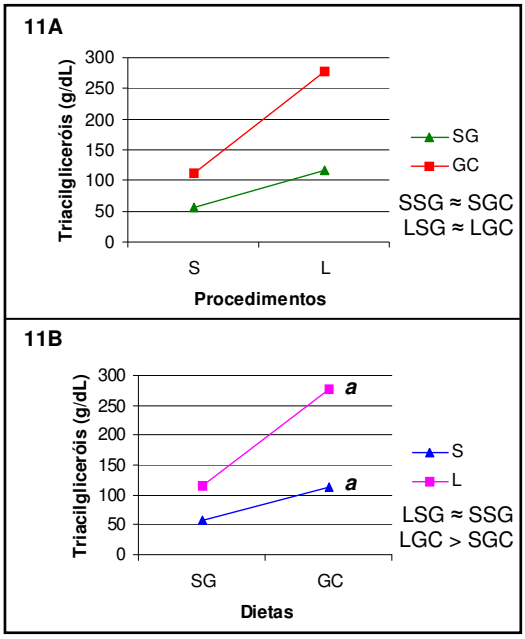

Figura 11 – TG – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (11A) e dietas (11B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase, nos animais com dieta GC, associou-se a maior TG, mas não houve diferença significativa entre os animais com dieta SG. A dieta SG associou-se a menor TG, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 6: NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA A (VA) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (mg/dL)	74,76	94,17	93,20	71,84
Máximo (mg/dL)	110,68	112,62	104,85	87,38
Mínimo (mg/dL)	58,25	79,61	77,67	64,08
AV (mg/dL)	52,43	33,01	27,18	23,30
DI (mg/dL)	15,53	7,77	15,53	4,85
Média (mg/dL)	74,95	94,76	89,90	72,49
DP (mg/dL)	14,88	9,19	9,20	6,51
CV (%)	19,85	9,70	10,23	8,98

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,35 ∴ *não significativa*

(LSG + SSG) > (LGC + SGC) p = 0,62 ∴ *não significativa*

Interação p < 0,0001 ∴ ***significativa***

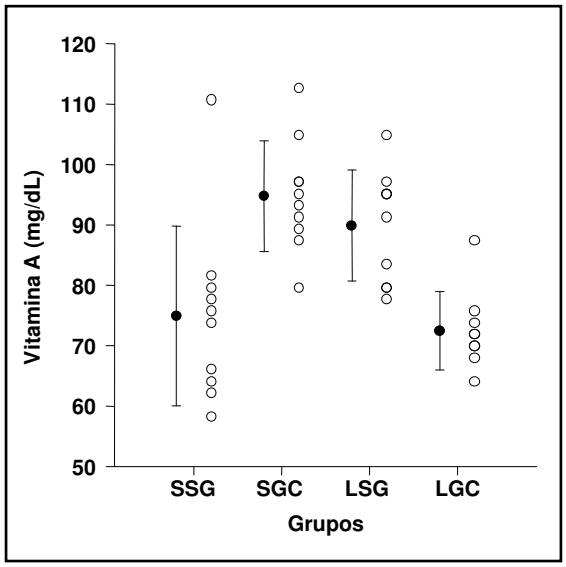

Figura 12 – VITAMINA A SÉRICA – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

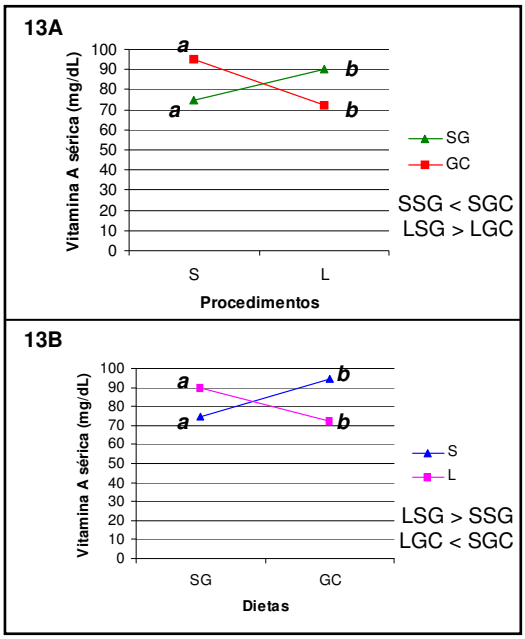

Figura 13 – VITAMINA A SÉRICA – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (13A) e dietas (13B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior VA nos animais com dieta SG e a menor VA nos animais com dieta GC. A dieta SG associou-se a maior VA nos animais com colestase e a menor VA nos animais sem colestase.

Tabela 7: TEMPO DE SONO – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (min.)	109,00	66,50	328,50	302,00
Máximo (min.)	252	92	459	641
Mínimo (min.)	58	40	238	140
AV (min.)	194	52	221	501
DI (min.)	78	16	125	236
Média (min.)	121,30	66,90	326,10	338,11
DP (min.)	64,25	15,74	74,87	168,65
CV (%)	52,97	23,52	22,96	49,88

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) > (LGC + SGC) $p = 0,03$ ∴ ***significativa***

Interação $p = 0,08$ ∴ *não significativa*

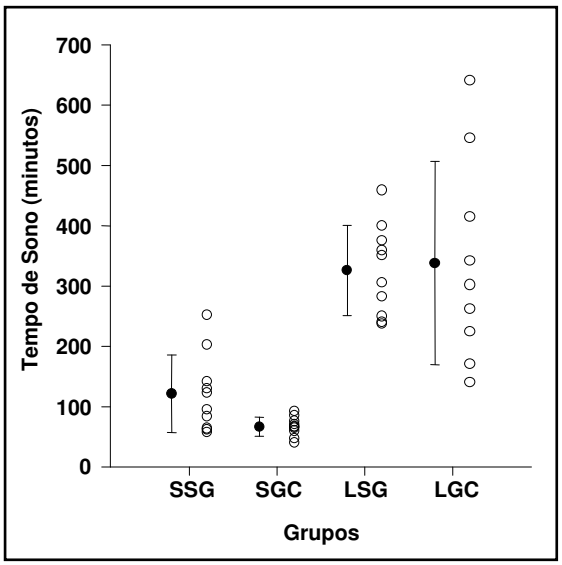

Figura 14 – TEMPO DE SONO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

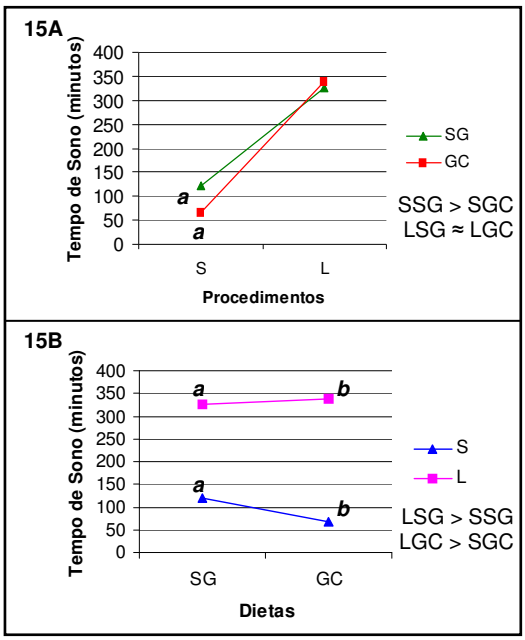

Figura 15 – TEMPO DE SONO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (15A) e dietas (15B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior TS, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. A dieta SG, nos animais sem colestase, associou-se a maior TS, mas não houve diferença na presença de colestase (LSG e LGC).

Tabela 8: ATIVIDADE SÉRICA DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (UI/L)	43,5	49,0	247,5	201,0
Máximo (UI/L)	62	67	621	681
Mínimo (UI/L)	27	29	80	90
AV (UI/L)	35	38	541	591
DI (UI/L)	17,0	18,0	172,0	256,5
Média (UI/L)	46,10	48,20	264,30	281,11
DP (UI/L)	11,08	11,37	172,20	194,04
CV (%)	24,03	23,59	65,15	69,03

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,721$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,9$ ∴ *não significativa*

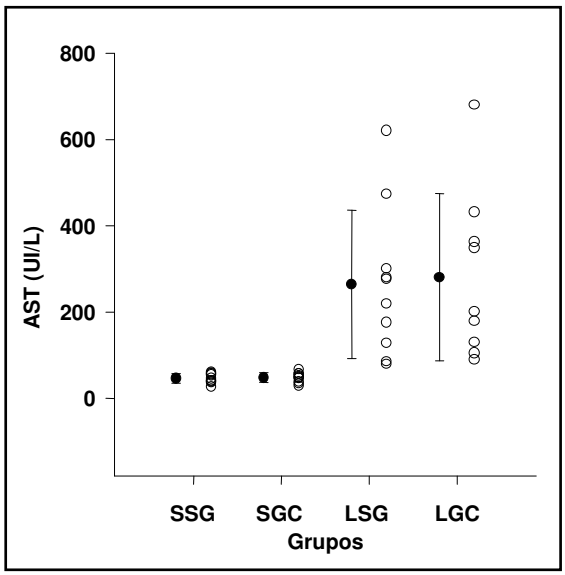

Figura 16 – AST – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

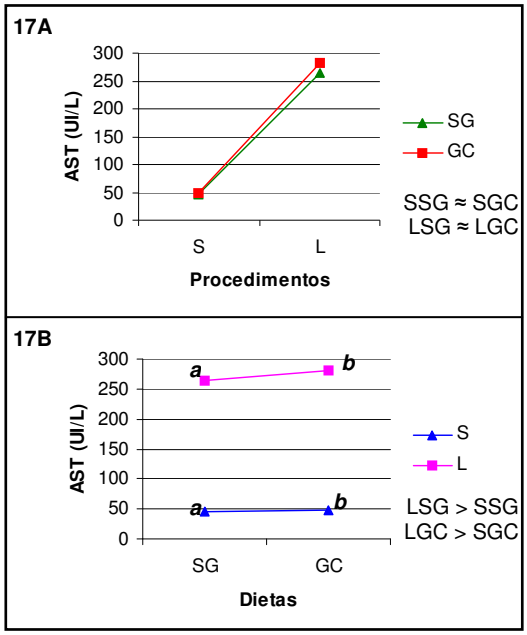

Figura 17 – AST – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (17A) e dietas (17B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior AST, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 9: ATIVIDADE SÉRICA DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (UI/L)	24,5	36,5	77,0	94,0
Máximo (UI/L)	37	44	150	310
Mínimo (UI/L)	16	22	30	47
AV (UI/L)	21	22	120	263
DI (UI/L)	9,0	13,0	53,0	105,75
Média (UI/L)	25,90	33,90	77,30	121,56
DP (UI/L)	6,54	7,88	35,38	87,58
CV (%)	25,25	23,24	45,77	72,05

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) $p = 0,018$ ∴ ***significativa***

Interação $p = 0,7$ ∴ *não significativa*

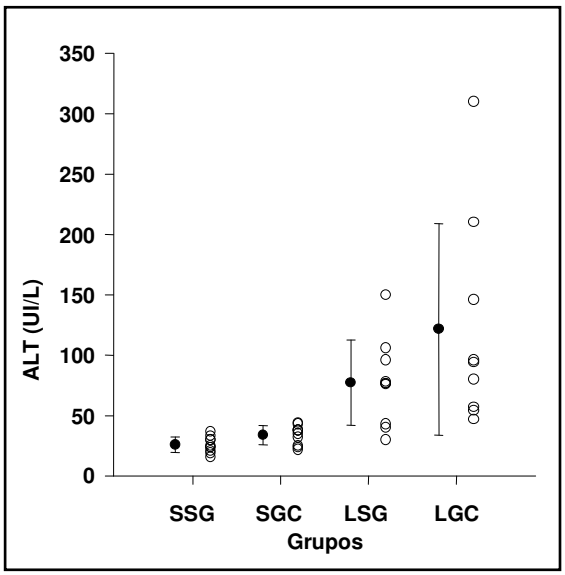

Figura 18 – ALT – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

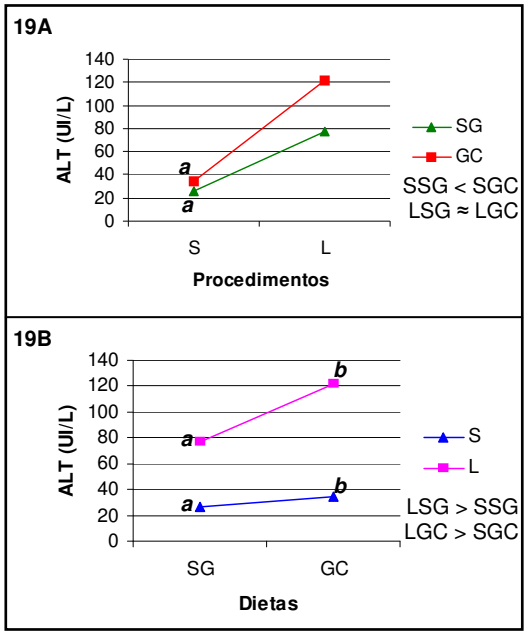

Figura 19 – ALT – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (19A) e dietas (19B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior ALT, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. A dieta SG, nos animais sem colestase, associou-se a menor ALT, mas não houve diferença na presença de colestase (LSG e LGC).

Tabela 10: NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	2,80	2,80	2,45	2,40
Máximo (g/dL)	2,90	3,10	2,90	2,70
Mínimo (g/dL)	2,70	2,40	2,00	1,50
AV (g/dL)	0,20	0,70	0,90	1,20
DI (g/dL)	0,10	0,10	0,30	0,43
Média (g/dL)	2,77	2,82	2,47	2,28
DP (g/dL)	0,07	0,19	0,27	0,37
CV (%)	2,44	6,63	10,81	16,24

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) < (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,49$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,12$ ∴ *não significativa*

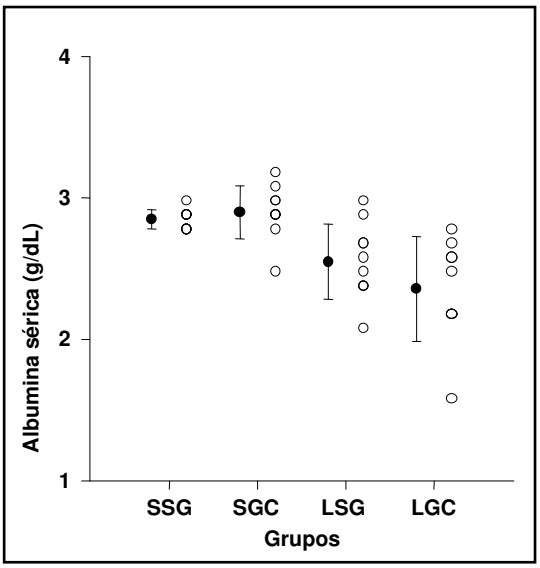

Figura 20 – ALBUMINA – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

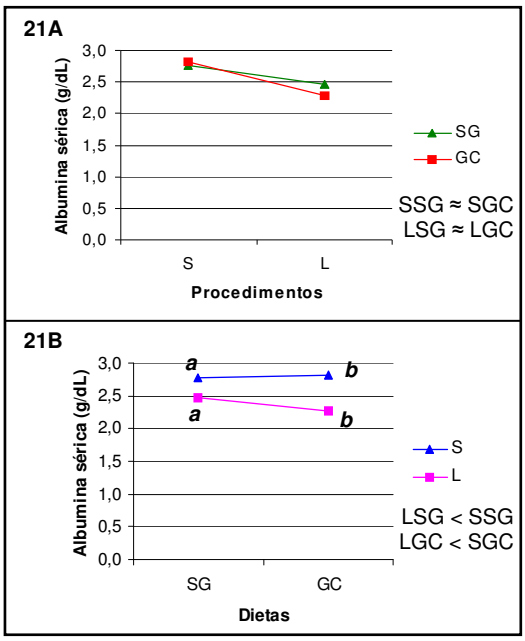

Figura 21 – ALBUMINA – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (21A) e dietas (21B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a menor albumina, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 11: NÍVEIS SÉRICOS DE GLOBULINAS – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/dL)	2,60	2,75	3,10	3,40
Máximo (g/dL)	2,90	3,10	3,90	4,20
Mínimo (g/dL)	2,30	2,50	2,50	2,30
AV (g/dL)	0,60	0,60	1,40	1,90
DI (g/dL)	0,30	0,30	1,00	0,55
Média (g/dL)	2,61	2,78	3,13	3,41
DP (g/dL)	0,19	0,19	0,51	0,53
CV (%)	7,32	6,94	16,42	15,63

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,08$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,66$ ∴ *não significativa*

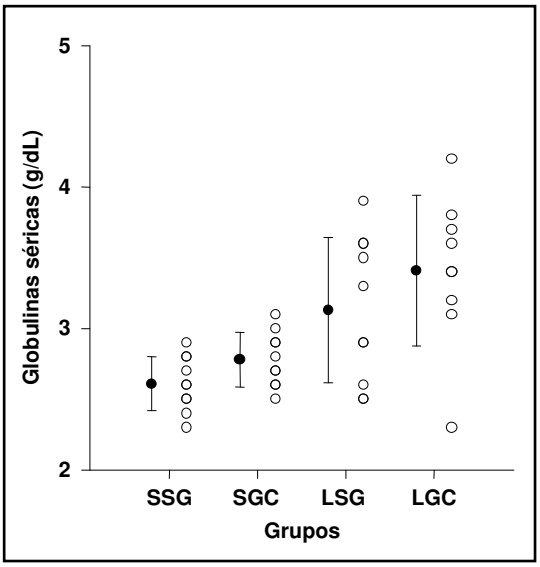

Figura 22 – GLOBULINAS – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

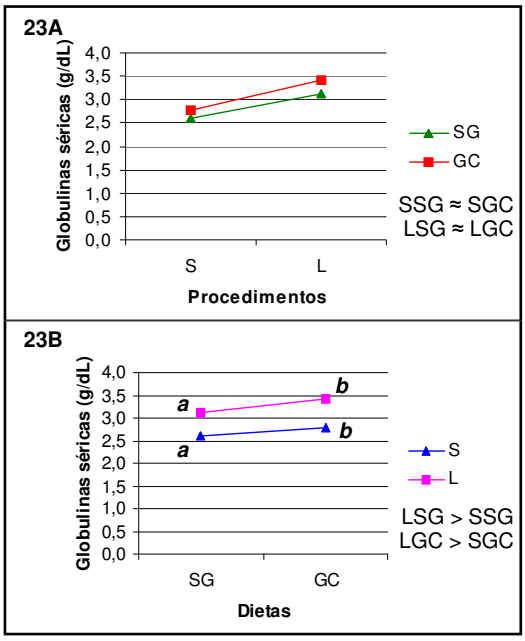

Figura 23 – GLOBULINAS – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (23A) e dietas (23B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior globulina, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 12: PESO RELATIVO DO FÍGADO (g/100g de peso do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	4,42	4,44	6,40	6,22
Máximo (g/100g)	5,23	5,53	8,98	7,44
Mínimo (g/100g)	3,62	4,04	5,26	4,42
AV (g/100g)	1,61	1,48	3,72	3,02
DI (g/100g)	0,70	0,21	1,28	1,67
Média (g/100g)	4,38	4,52	6,64	6,30
DP (g/100g)	0,54	0,41	1,09	1,03
CV (%)	12,35	9,15	16,35	16,41

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,7$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,36$ ∴ *não significativa*

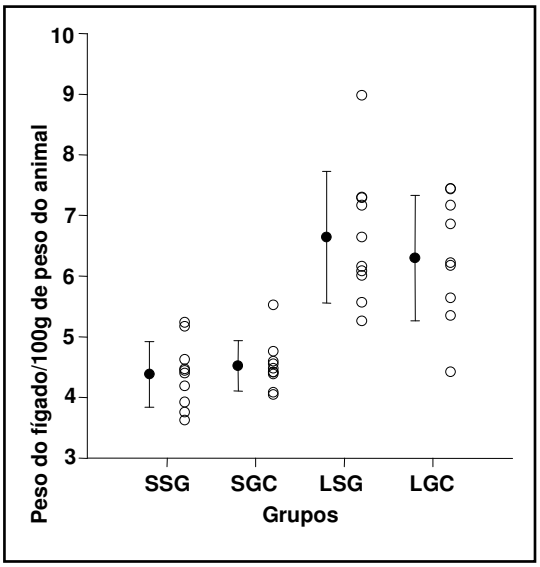

Figura 24 – PESO RELATIVO DO FÍGADO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

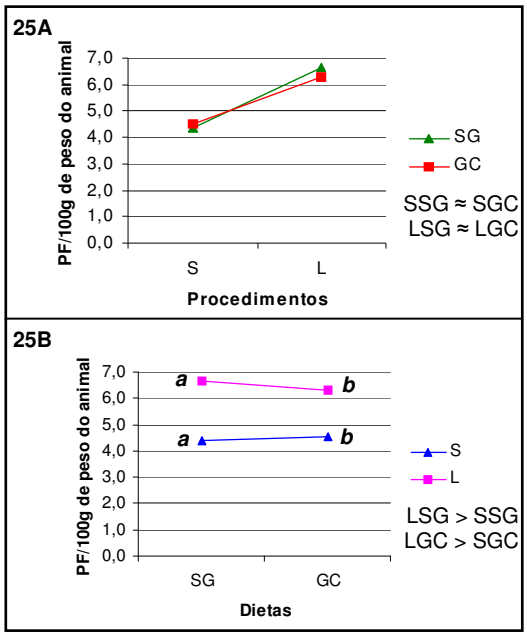

Figura 25 – PESO RELATIVO DO FÍGADO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (25A) e dietas (25B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior peso do fígado, relativo ao peso do animal, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 13: CONTEÚDO DE ÁGUA DO FÍGADO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	3,190	3,109	5,012	4,839
Máximo (g/100g)	3,780	3,699	6,986	5,962
Mínimo (g/100g)	2,548	2,765	3,968	3,571
AV (g/100g)	1,232	0,934	3,018	2,391
DI (g/100g)	0,564	0,167	0,914	1,175
Média (g/100g)	3,156	3,134	5,163	4,928
DP (g/100g)	0,411	0,245	0,869	0,786
CV (%)	13,02	7,82	16,83	15,95

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,6$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,62$ ∴ *não significativa*

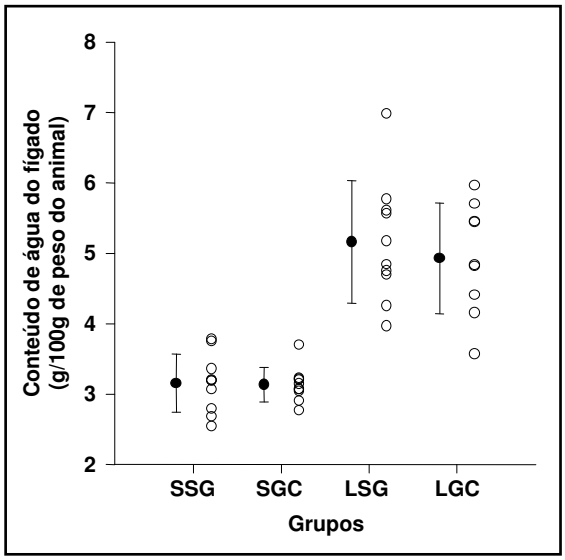

Figura 26 – CONTEÚDO DE ÁGUA DO FÍGADO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

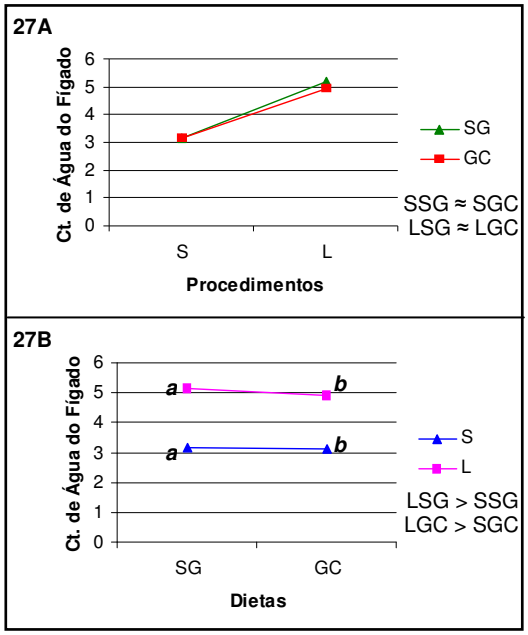

Figura 27 – CONTEÚDO DE ÁGUA DO FÍGADO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (27A) e dietas (27B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior conteúdo de água do fígado, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 14: CONTEÚDO DE GORDURA DO FÍGADO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	0,144	0,286	0,176	0,214
Máximo (g/100g)	0,230	0,538	0,988	0,293
Mínimo (g/100g)	0,059	0,197	0,099	0,061
AV (g/100g)	0,170	0,341	0,889	0,232
DI (g/100g)	0,041	0,110	0,026	0,094
Média (g/100g)	0,137	0,314	0,251	0,188
DP (g/100g)	0,050	0,120	0,263	0,078
CV (%)	36,50	38,22	104,78	41,38

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) ≈ (SSG + SGC) p = 0,69 ∴ *não significativa*

(LSG + SSG) < (LGC + SGC) p = 0,029 ∴ ***significativa***

Interação p = 0,003∴ ***significativa***

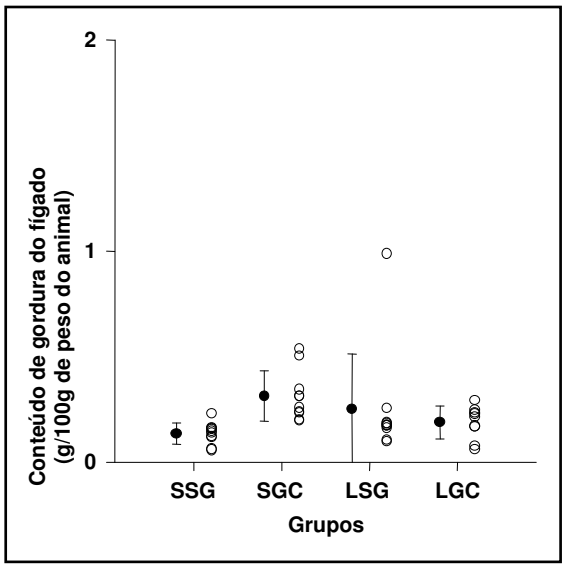

Figura 28 – CONTEÚDO DE GORDURA DO FÍGADO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

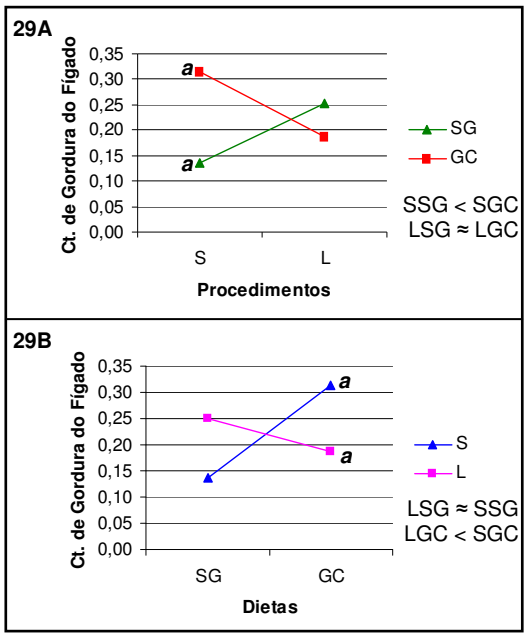

Figura 29 – CONTEÚDO DE GORDURA DO FÍGADO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (29A) e dietas (29B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase, nos animais com dieta GC, associou-se a menor conteúdo de gordura do fígado, mas não houve diferença significativa entre os animais com dieta SG. A dieta SG, nos animais sem colestase, associou-se a menor conteúdo de gordura do fígado, mas não houve diferença na presença de colestase (LSG e LGC).

Tabela 15: PESO RELATIVO DO BAÇO (por 100g de peso do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	0,38	0,32	0,83	0,83
Máximo (g/100g)	0,67	1,00	1,09	1,02
Mínimo (g/100g)	0,26	0,24	0,52	0,48
AV (g/100g)	0,41	0,76	0,57	0,55
DI (g/100g)	0,25	0,15	0,28	0,45
Média (g/100g)	0,44	0,42	0,85	0,78
DP (g/100g)	0,15	0,25	0,18	0,23
CV (%)	33,71	58,77	21,58	29,60

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p > 0,0001 ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) p = 0,5 ∴ *não significativa*

Interação p = 0,7 ∴ *não significativa*

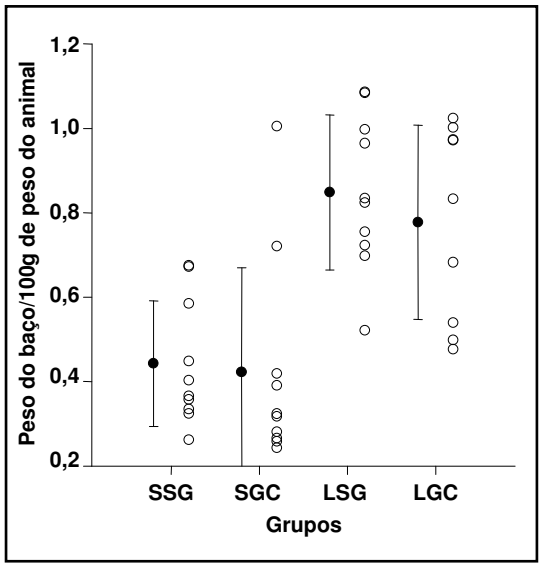

Figura 30 – PESO RELATIVO DO BAÇO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

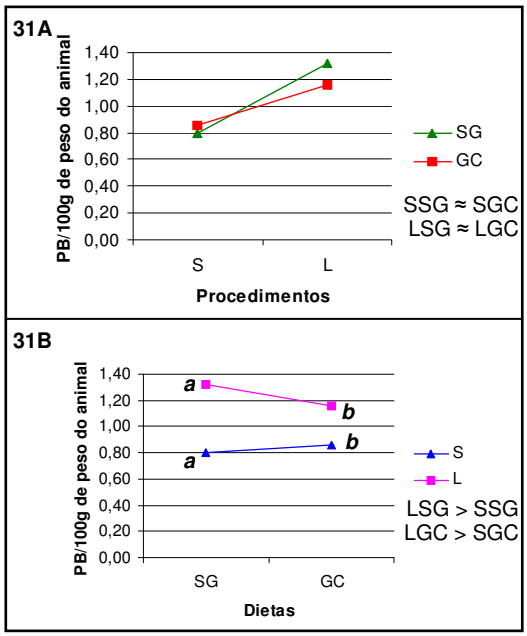

Figura 31 – PESO RELATIVO DO BAÇO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (31A) e dietas (31B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior peso do baço, relativo ao peso do animal, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 16: CONTEÚDO DE ÁGUA DO BAÇO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	0,345	0,307	0,712	0,710
Máximo (g/100g)	0,553	0,812	0,922	0,836
Mínimo (g/100g)	0,259	0,239	0,456	0,362
AV (g/100g)	0,293	0,573	0,466	0,474
DI (g/100g)	0,143	0,103	0,195	0,317
Média (g/100g)	0,384	0,370	0,711	0,654
DP (g/100g)	0,103	0,186	0,142	0,177
CV (%)	26,82	50,27	19,97	27,06

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) $p = 0,32$ ∴ *não significativa*

Interação $p = 0,962$ ∴ *não significativa*

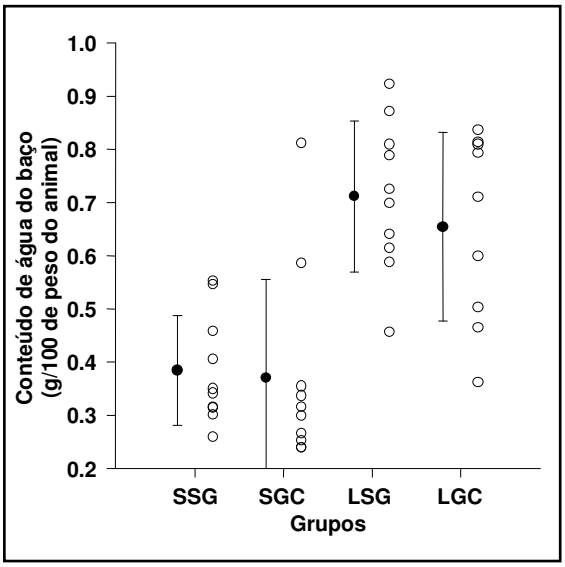

Figura 32 – CONTEÚDO DE ÁGUA DO BAÇO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

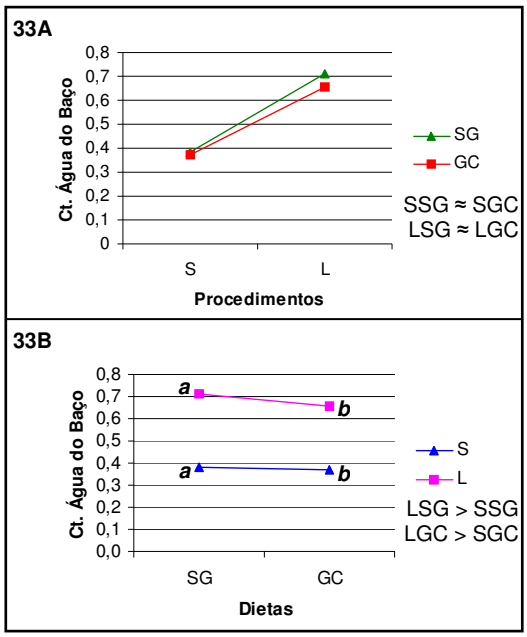

Figura 33 – CONTEÚDO DE ÁGUA DO BAÇO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (33A) e dietas (33B). *Médias seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste t (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior conteúdo de água do baço, tanto nos animais com dieta SG como nos animais com dieta GC. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase.

Tabela 17: CONTEÚDO DE GORDURA DO BAÇO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV), distância interquartís (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana (g/100g)	0,011	0,011	0,014	0,022
Máximo (g/100g)	0,022	0,027	0,031	0,041
Mínimo (g/100g)	0,001	0,001	0,005	0,003
AV (g/100g)	0,021	0,026	0,026	0,037
DI (g/100g)	0,008	0,008	0,014	0,017
Média (g/100g)	0,010	0,012	0,016	0,020
DP (g/100g)	0,006	0,008	0,009	0,013
CV (%)	62,84	70,17	54,31	63,18

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variâncias e foram substituídos por valores transformados.

Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: dieta SG x dieta GC):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,028 ∴ ***significativa***

(LSG + SSG) ≈ (LGC + SGC) p = 0,457 ∴ *não significativa*

Interação p = 0,84 ∴ *não significativa*

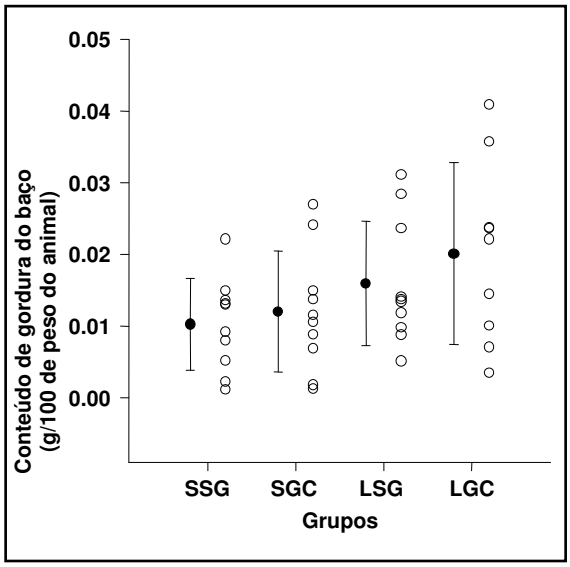

Figura 34 – CONTEÚDO DE GORDURA DO BAÇO – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.

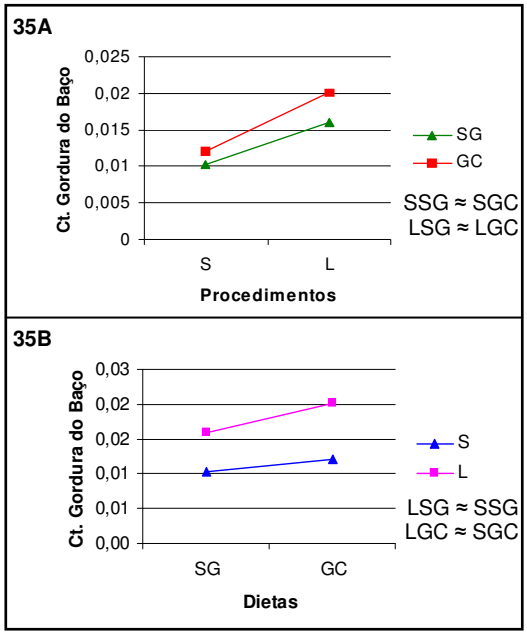

Figura 35 – CONTEÚDO DE GORDURA DO BAÇO – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (35A) e dietas (35B).

Conclusões: A colestase associou-se a maior conteúdo de gordura do baço, independentemente da dieta. Não pudemos demonstrar diferença estatisticamente significativa quanto ao tipo de dieta, independentemente da presença ou não de colestase. Não houve interação entre presença ou não de colestase e tipo de dieta.

Tabela 18: INTENSIDADE DA FIBROSE PORTAL – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	2	3
Máximo	0	0	3	3
Mínimo	0	0	1	2
AV	0	0	2	1
DI	0	0	1	1

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

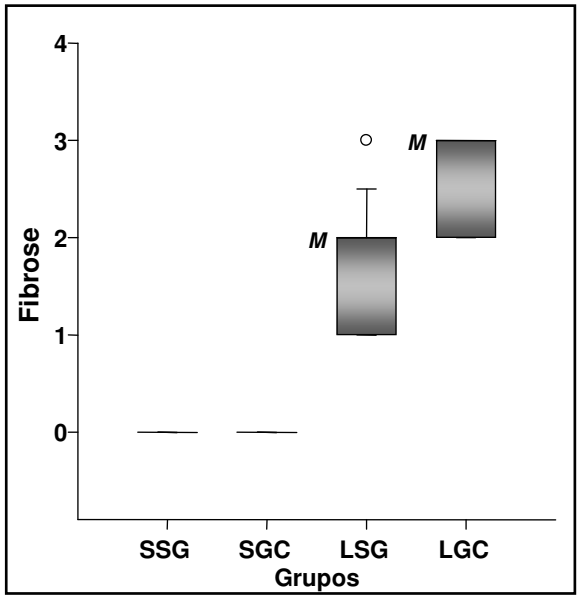

Figura 36 – INTENSIDADE DA FIBROSE PORTAL – Gráfico tipo "Box and Whiskers". A letra *M* corresponde à mediana.

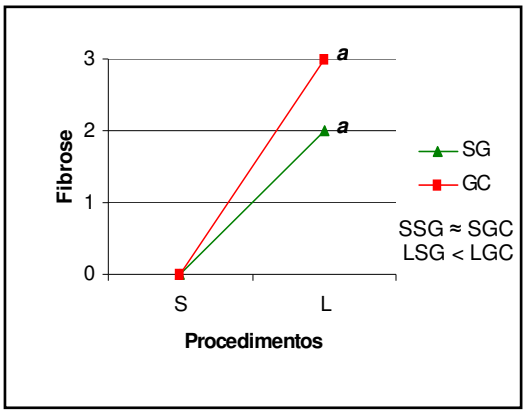

Figura 37 – INTENSIDADE DA FIBROSE PORTAL – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos. *Medianas seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste Wilcoxon (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior intensidade da fibrose portal, independentemente da dieta. A dieta SG, nos animais com colestase, associou-se a menor fibrose portal, mas não houve diferença na ausência de colestase (SSG e SGC).

Tabela 19: INTENSIDADE DA PROLIFERAÇÃO DUCTAL – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	2	3
Máximo	0	0	3	3
Mínimo	0	0	1	2
AV	0	0	2	1
DI	0	0	1	1

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

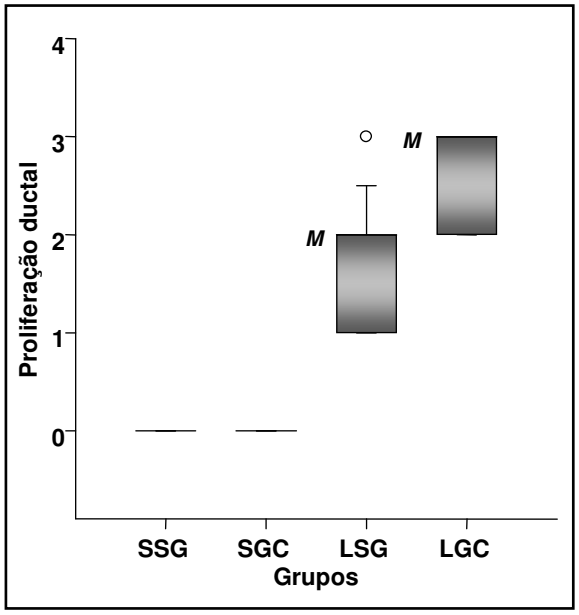

Figura 38 – INTENSIDADE DA PROLIFERAÇÃO DUCTAL – Gráfico tipo "Box and Whiskers". A letra *M* corresponde à mediana.

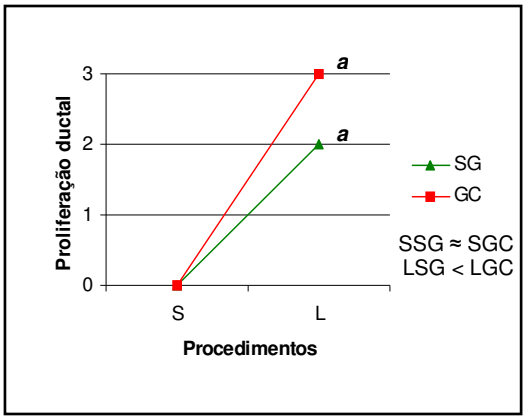

Figura 39 – INTENSIDADE DA PROLIFERAÇÃO DUCTAL – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos. *Medianas seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste Wilcoxon (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior intensidade da proliferação ductal, independentemente da dieta. A dieta SG, nos animais com colestase, associou-se a menor proliferação ductal, mas não houve diferença na ausência de colestase (SSG e SGC).

Tabela 20: INTENSIDADE DA FIBROSE PERICELULAR – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	1	1
Máximo	0	0	2	3
Mínimo	0	0	0	1
AV	0	0	2	2
DI	0	0	1	1

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

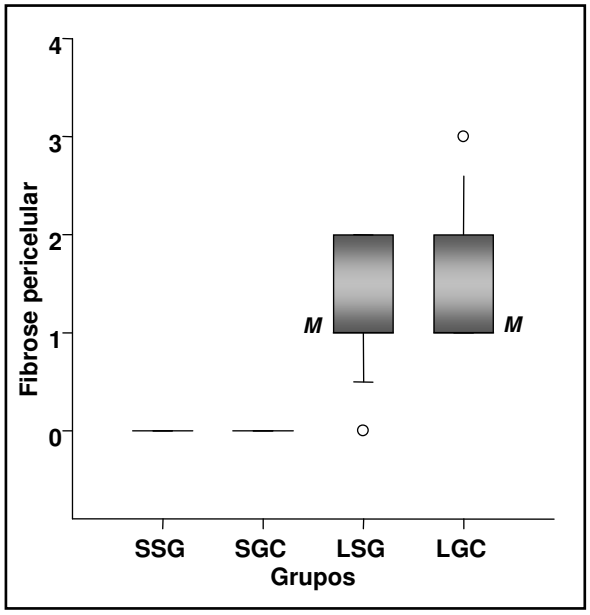

Figura 40 – INTENSIDADE DA FIBROSE PERICELULAR – Gráfico tipo "Box and Whiskers". A letra *M* corresponde à mediana.

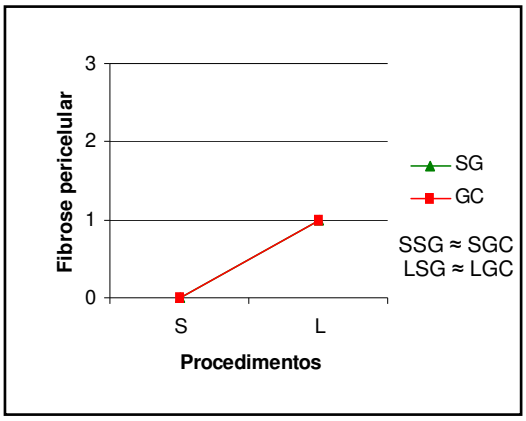

Figura 41 – INTENSIDADE DA FIBROSE PERICELULAR – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos.

Conclusões: A colestase associou-se a maior intensidade da fibrose pericelular, independentemente da dieta. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, na presença ou não de colestase.

Tabela 21: INTENSIDADE DA ESTEATOSE – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	0	0
Máximo	1	3	1	1
Mínimo	0	0	0	0
AV	1	3	1	1
DI	0	0	1	1

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) ≈ (SSG + SGC) p = 0,12 ∴ *não significativa*

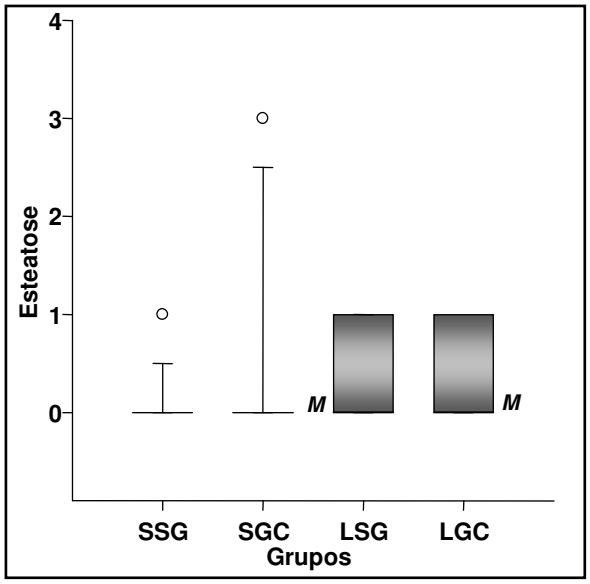

Figura 42 – INTENSIDADE DA ESTEATOSE – Gráfico tipo "Box and Whiskers". A letra *M* corresponde à mediana.

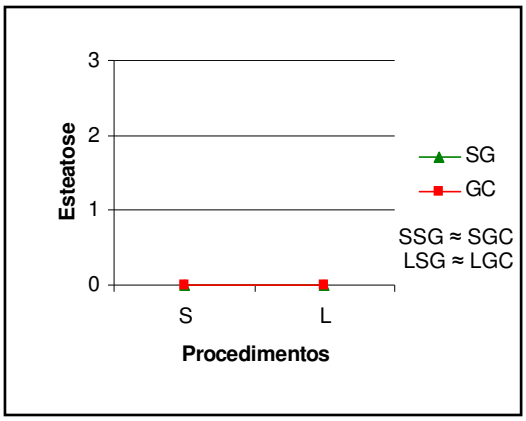

Figura 43 – INTENSIDADE DA ESTEATOSE – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos.

Conclusões: Não pudemos demonstrar diferença estatisticamente significativa quanto a presença ou não de colestase, independentemente da dieta e quanto ao tipo de dieta, na presença ou não de colestase.

Tabela 22: INTENSIDADE DA DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	1	0
Máximo	1	1	1	1
Mínimo	0	0	0	0
AV	1	1	1	1
DI	0	0	1	1

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) p = 0,0361 ∴ ***significativa***

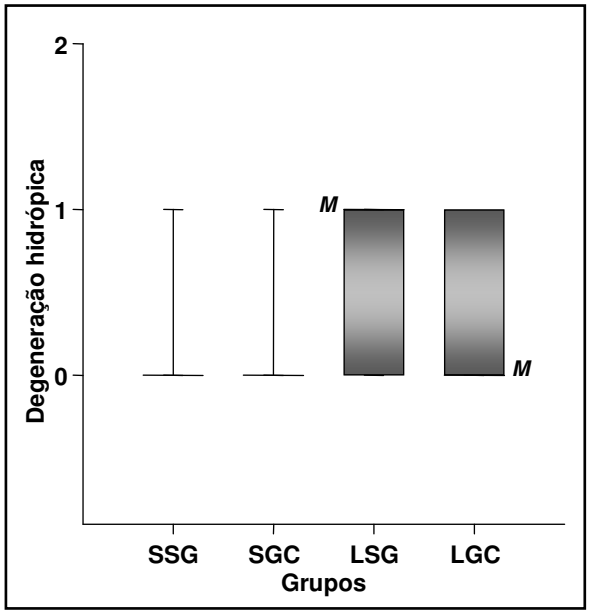

Figura 44 – INTENSIDADE DA DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA – Gráfico tipo "Box and Whiskers". A letra *M* corresponde à mediana.

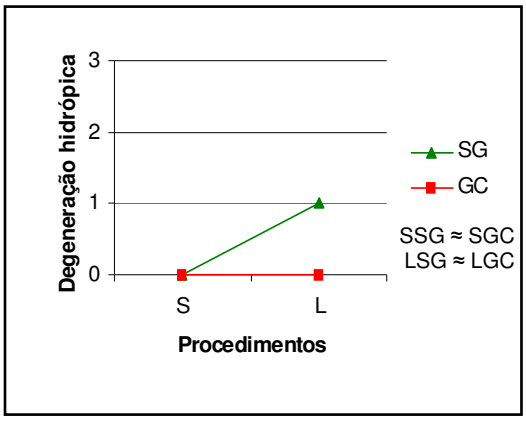

Figura 45 – INTENSIDADE DA DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos. *Medianas seguidas de mesma letra diferem significativamente entre si pelo teste Wilcoxon (p<0,05).*

Conclusões: A colestase associou-se a maior intensidade de degeneração hidrópica, independentemente da dieta. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, na presença ou não de colestase.

Tabela 23: NÚMERO DE ÁREAS DE NECROSE – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	0	0	4	8
Máximo	0	0	20	25
Mínimo	0	0	1	0
AV	0	0	19	25
DI	0	0	13	10,75

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

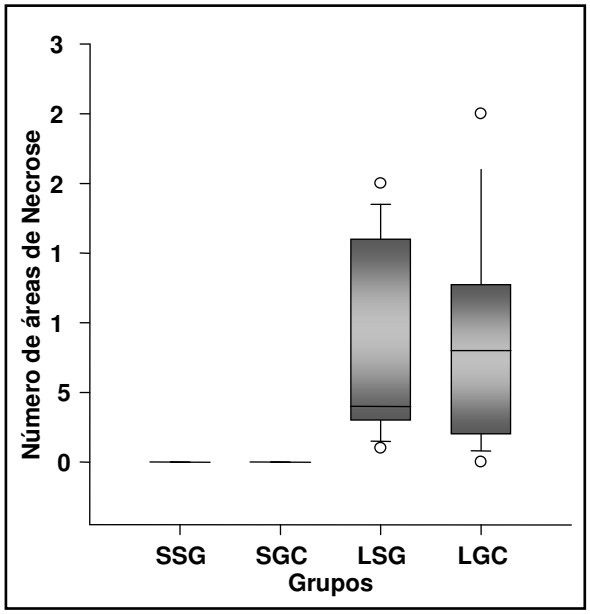

Figura 46 – NÚMERO DE ÁREAS DE NECROSE – Gráfico tipo "Box and Whiskers".

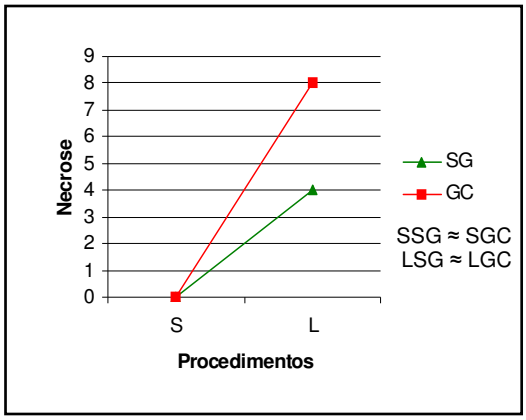

Figura 47 – NÚMERO DE ÁREAS DE NECROSE – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos.

Conclusões: A colestase associou-se a maior número de áreas de necrose, independentemente da dieta. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, na presença ou não de colestase.

Tabela 24: FREQÜÊNCIA DE MITOSES – Estatística descritiva. Mediana, valores máximo e mínimo, amplitude de variação (AV) e distância interquartís (DI).

Grupos	SSG	SGC	LSG	LGC
Mediana	3	4,5	8,5	6
Máximo	9	9	21	17
Mínimo	0	0	5	0
AV	9	9	16	17
DI	4,5	6	8	12

SSG – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com óleo de milho em baixa concentração (dieta SG); **SGC** – Grupo sem colestase (operação simulada) e dieta com gordura de coco de babaçu (dieta GC); **LSG** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta SG; **LGC** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e dieta GC.

ESTATÍSTICA COMPARATIVA

Teste de Wilcoxon para a comparação entre os procedimentos (comparação entre LSG e LGC tomados em conjunto e SSG e SGC tomados em conjunto):

(LSG + LGC) > (SSG + SGC) $p < 0,0001$ ∴ ***significativa***

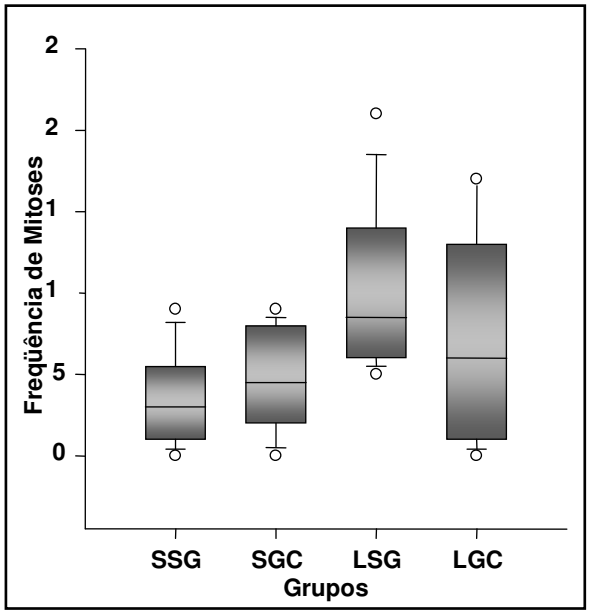

Figura 48 – FREQÜÊNCIA DE MITOSES – Gráfico tipo "Box and Whiskers".

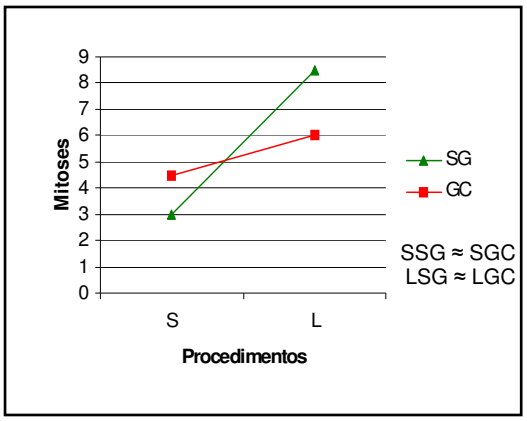

Figura 49 – FREQÜÊNCIA DE MITOSES – Comparação múltipla pareada entre os grupos fixando-se procedimentos.

Conclusões: A colestase associou-se a maior freqüência de mitose, independentemente da dieta. Não pudemos demonstrar diferença significativa quanto ao tipo de dieta, na presença ou não de colestase.

Tabela 25: CORRELAÇÃO DE *Spearman* APLICADA ÀS VARIÁVEIS HISTOLÓLICAS NO GRUPO LSG

Grupo LSG	Fibrose Portal	Prolif. Ductal	Fibrose Pericel.	Esteatose	Degen. Hidrópica	Necrose
Fibrose Portal	--------	p < 0,0001 r = 1 *significativa*	p = 0,1124 r = 0,5333 *n.s.*	p = 0,3162 r = 0,3535 *n.s.*	p = 2815 r = 3779 *n.s.*	p = 0,9111 r = - 0,0407 *n.s.*
Proliferação Ductal	--------	--------	p = 0,1124 r = 0,5333 *n.s.*	p = 0,3162 r = 0,3535 *n.s.*	p = 2815 r = 3779 *n.s.*	p = 0,9111 r = - 0,0407 *n.s.*
Fibrose Pericelular	--------	--------	--------	p = 0,0730 r = 0,5889 *n.s.*	p = 1 r = 0 *n.s.*	p = 0,4250 r = - 0,2849 *n.s.*
Esteatose	--------	--------	--------	--------	p = 0,1114 r = 0,5345 *n.s.*	p = 0,5493 r = - 0,2158 *n.s.*
Degeneração Hidrópica	--------	--------	--------	--------	--------	p = 0,4520 r = - 0,2692 *n.s.*
Mitose	p = 0,0335 r = - 0,6715 *significativa*	p = 0,0335 r = - 0,6715 *significativa*	p = 0,0061 r = - 0,7936 *significativa*	p = 0,0430 r = - 0,6475 *significativa*	p = 0,3273 r = - 0,3461 *n.s.*	p = 0,8781 r = - 0,0559 *n.s.*

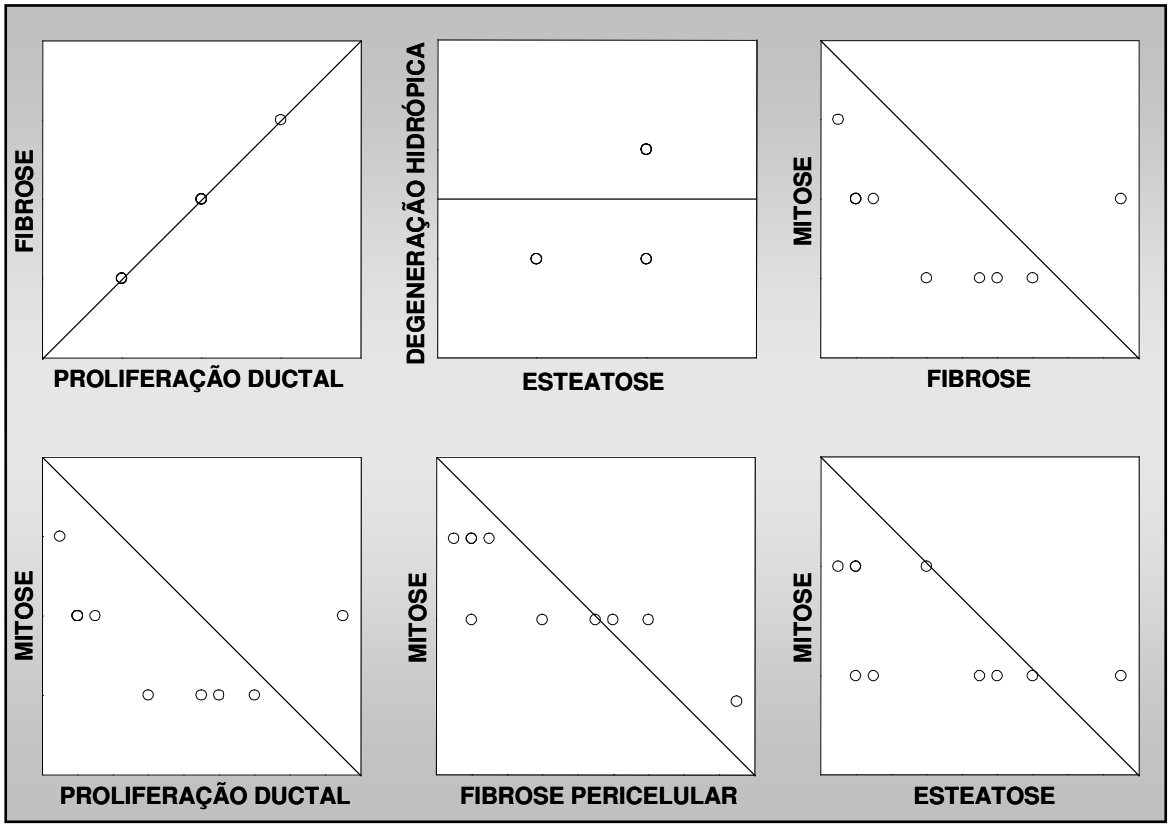

Figura 50 – Variáveis histológicas no grupo LSG (ligadura do ducto biliar comum com dieta SG). Gráficos de dispersão mostrando os resultados da análise de correlação de Spearman.

Conclusões: Houve correlação positiva entre a intensidade da fibrose portal e a intensidade da proliferação ductal (aumentaram no mesmo sentido) e correlação negativa entre mitose e fibrose portal, mitose e proliferação ductal, mitose e fibrose pericelular, mitose e esteatose (aumentaram em sentidos opostos).

Tabela 26: CORRELAÇÃO DE *Spearman* APLICADA ÀS VARIÁVEIS HISTOLÓLICAS NO GRUPO LGC

Grupo LGC	Fibrose Portal	Prolif. Ductal	Fibrose Pericel.	Esteatose	Degen. Hidrópica	Necrose
Fibrose Portal	--------	p < 0,0001 r = 1 *significativa*	p = 0,5983 r = 0,2041 *n.s.*	p = 0,6845 r = 0,1581 *n.s.*	p = 1 r = 0 *n.s.*	p = 0,9068 r = 0,0458 *n.s.*
Proliferação Ductal	--------	--------	p = 0,5983 r = 0,2041 *n.s.*	p = 0,6845 r = 0,1581 *n.s.*	p = 1 r = 0 *n.s.*	p = 0,9068 r = 0,0458 *n.s.*
Fibrose Pericelular	--------	--------	--------	p = 0,6176 r = - 0,1936 *n.s.*	p = 0,0796 r = - 0,6123 *n.s.*	p = 0,3211 r = - 0,3742 *n.s.*
Esteatose	--------	--------	--------	--------	p = 0,0112 r = 0,7906 *significativa*	p = 0,7380 r = - 0,1304 *n.s.*
Degeneração Hidrópica	--------	--------	--------	--------	--------	p = 0,5531 r = 0,2292 *n.s.*
Mitose	p = 0,7243 r = - 0,1375 *n.s.*	p = 0,7243 r = - 0,1375 *n.s.*	p = 0,0467 r = - 0,6736 *significativa*	p = 1 r = 0 *n.s.*	p = 0,3317 r = 0,3667 *n.s.*	p = 0,9658 r = - 0,0168 *n.s.*

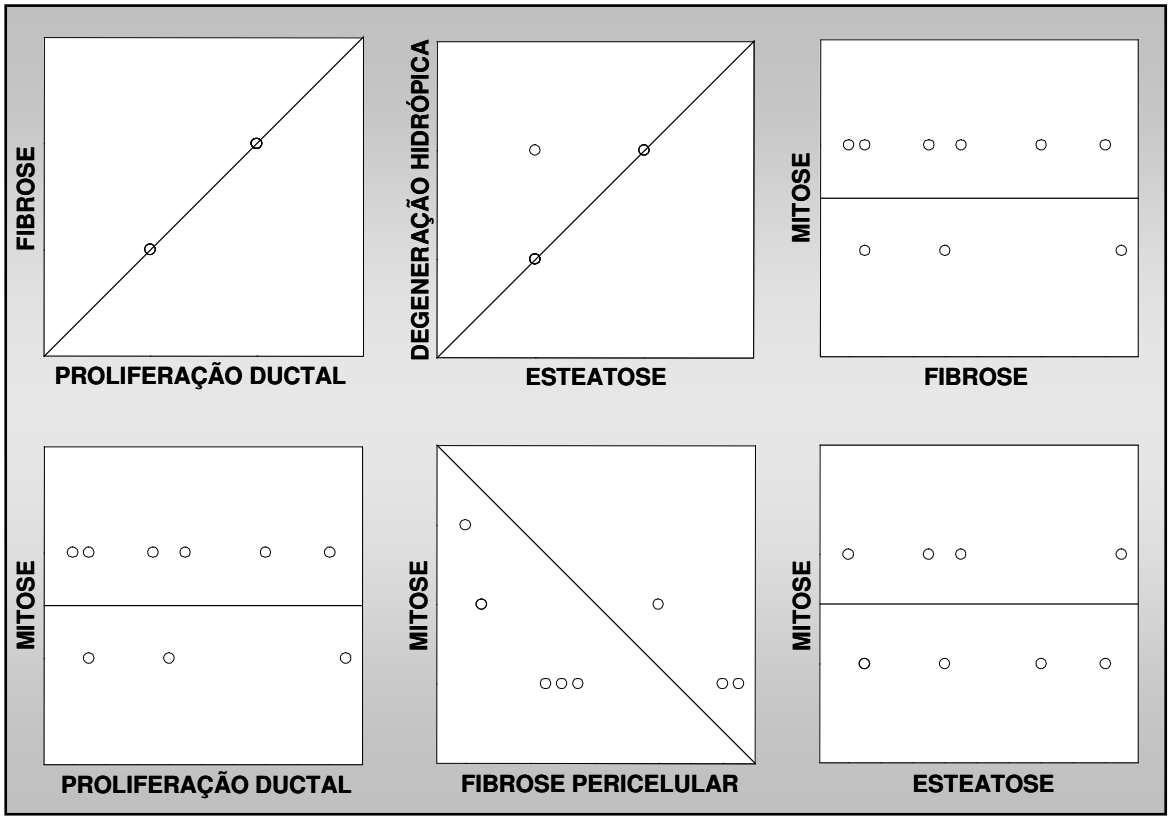

Figura 51 – Variáveis histológicas no grupo LGC (ligadura do ducto biliar comum com dieta GC). Gráficos de dispersão mostrando os resultados da análise de correlação de Spearman.

Conclusões: Houve correlação positiva entre a intensidade da fibrose portal e a intensidade da proliferação ductal, degeneração hidrópica e esteatose (aumentaram no mesmo sentido) e correlação negativa entre mitose e fibrose pericelular (aumentaram em sentidos opostos).

Discussão dos Resultados

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. LIPÍDIOS SÉRICOS

Em nosso trabalho, a colestase aumentou os níveis séricos de colesterol total (CT) em ambas dietas, e a dieta que contém gordura de coco de babaçu aumentou os níveis de CT tanto em ratos com colestase quanto em ratos sem colestase. Portanto, o mecanismo de aumento do CT provocado pela dieta GC não sofreu influência da colestase, já que não houve interação entre os procedimentos e as dietas estudadas. A literatura mostra que ocorre aumento de CT em animais colestáticos devido a síntese hepática aumentada e diminuição na secreção biliar (TAKITA et al. 1988). Entretanto, o efeito hipercolesterolêmico da dieta GC é devido ao seu conteúdo de gordura saturada.

Dieta rica em ácidos graxos saturados aumenta os níveis de colesterol plasmático e LDL-colesterol quando comparada com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos saturados variam em seu efeito hipercolesterolêmico, sendo citado em ordem crescente de potência: mirístico, palmítico e láurico (DENKE & GRUNDY, 1992; ZOCK et al., 1994; COX et al., 1995). A gordura de coco de babaçu da dieta GC, que contém em 100g da gordura 42,4g de ácido láurico, 16,5g de ácido mirístico e 9,9g de ácido palmítico, causou o aumento do colesterol tanto nos animais com colestase como nos animais sem colestase.

Efeitos da colestase elevando os níveis séricos de LDL-c, VLDL-c e triacilgliceróis (TG) só foram evidenciados nos animais recebendo dieta GC. Não evidenciamos efeito da colestase nos animais que receberam dieta SG. Concentração plasmática elevada de TG tem sido demonstrada em indivíduos consumindo gordura saturada na dieta (MAZIER & JONES, 1997) e também tem sido associada com os níveis de VLDL em animais alimentados com uma dieta enriquecida com ácido mirístico (HASSEL et al.,1997). A hipertrigliceridemia produzida pela dieta com gordura de coco de babaçu pode ser causada pelo aumento da liberação hepática de VLDL-triacilgliceról na circulação, visto que outros investigadores tem demonstrado um aumento da produção hepática de VLDL em animais alimentados com uma dieta contendo 15% de óleo de palmeira,

que contém mais de 90% de ácidos graxos saturados (ABDEL-FATTAH et al., 1998).

Além disso, a maior parte dos TCL contidos na dieta GC que são absorvidos pelos enterócitos não é utilizada como fonte de energia na colestase. Nos hepatócitos, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) atravessam a dupla membrana mitocondrial num processo dependente de carnitina (BACH & BABAYAN, 1982). Em ratos com cirrose biliar secundária, induzida por ligadura do ducto biliar, a biossíntese de carnitina é 52% diminuída (KRÄHENBÜHL et al., 2000) e, portanto, o processo de β-oxidação dos AGCL é prejudicado.

Nos animais sem colestase a dieta GC associou-se a maiores níveis séricos de vitamina A, provavelmente por maior absorção da gordura e, conseqüentemente, maior absorção de vitamina A. Na colestase a dieta GC associou-se a menores níveis séricos de Vitamina A do que a dieta SG, provavelmente porque a dieta GC, associando a maior lesão hepática (ver a seguir), pode ter causado diminuição da síntese de proteína transportadora de retinol.

5.2. ANÁLISE DA FUNÇÃO HEPÁTICA

O prolongamento do tempo de sono observado nos animais com colestase pode ser explicado pela diminuição das isoenzimas do citocromo P-450, que ocorre na lesão hepatocítica induzida pela ligadura do ducto biliar (TATEISHI et al., 1998). Esse teste reflete a velocidade de desintoxicação do pentobarbital pelos citocromos P-450 dos hepatócitos (LUTZ & KRAFFT, 1997).

A dieta SG aumentou o tempo de sono nos animais sem colestase provavelmente por menor estímulo do sistema hepático microssomal, que pode ser causado tanto pelo seu conteúdo de gordura reduzido como pelo tipo de gordura. HOPKINGS & WEST (1976) estudando ratos adultos sem colestase, encontraram maior tempo de sono e menor concentração de citocromo P-450 em ratos alimentados com dieta contendo TCL (óleo de semente de girassol) do que em ratos alimentados com dieta contendo gordura saturada (de origem animal). MOUNIE et al. (1981) estudaram diferentes proporções de óleo de milho (0%, 1,5%, 3%, 4,5%, 6%) e, após tratamento com pentobarbital, estímulo do

citocromo P-450 e da UDP-glicoroniltransferase (UDPGT) foi maior em animais que receberam dieta com gordura do que em animais que receberam dieta livre de gordura, concordando com nosso resultados.

Várias substâncias organocloradas, contidas em pesticidas, exercem efeito estimulatório sobre citocromo P-450 (CAMPBELL et al., 1983). Dos antioxidantes utilizados como aditivos alimentares (ANVISA, 1999), o ácido ascórbico também exerce esse efeito (RAMANATHAN et al., 2003). Entretanto, a gordura de coco de babaçu utilizada em nosso trabalho não contém antioxidantes em sua composição, conforme informações do fabricante (Compania Leco de Produtos Alimentícios®).

A hipoalbuminemia foi observada nos animais com colestase e pode refletir alterações no metabolismo intermediário, assim como síntese hepática reduzida (GOUMA et al., 1986). Não demonstramos diferença quanto às dietas estudadas.

5.3. LESÃO HEPÁTICA

A atividade sérica das aminotransferases (AST e ALT) é indicador da velocidade de destruição dos hepatócitos (SHERLOCK & DOOLEY, 2002). Em nosso estudo, níveis séricos elevados de AST e ALT foram observados nos animais colestáticos, sem diferença quanto às dietas estudadas. Os nossos resultados estão de acordo com outros experimentos encontrados na literatura, com aumento de AST (KRÄHENBÜHL et al., 2000) e de ALT (MURIEL & MORENO, 2004) em animais com obstrução biliar.

O aumento dos níveis séricos de globulina foi observado nos animais com colestase, independentemente do tipo de dieta. GOUMA et al. (1986) encontram aumento de α, β e γ globulina em animais com ligadura do ducto biliar e, segundo esses autores, diferentes mecanismos podem ser responsáveis pelo aumento dessas proteínas. A IgA é excretada na bile e pode ser regurgitada no soro após ligadura do ducto biliar. SUNG et al. (1995) observaram em pacientes com obstrução biliar supressão da secreção de IgA na bile e elevado nível sérico desta imunoglobulina. Estudos experimentais (DEITCH et al., 1990) e clínicos (WELSH et al., 1998) mostram que ocorre comprometimento da integridade da mucosa

gastrointestinal na colestase obstrutiva, permitindo a passagem de bactérias entéricas e endotoxinas; e a endotoxemia pode causar aumento dos níveis de IgA e IgG circulantes (OHSHIO et al., 1988).

A hepatomegalia, encontrada nos animais com colestase, reflete a deposição de tecido conjuntivo, a formação de nódulos regenerativos e a proliferação ductal (WASER &TAN, 1999). Outros estudos experimentais, com ratos submetidos a ligadura do ducto biliar, também mostraram maior peso do fígado (TAKITA et al., 1988; KRÄHENBÜHL et al., 2000; De VRIESE et al., 2001)

O aumento do peso e do conteúdo de água do baço é conseqüente à congestão esplênica devido a hipertensão portal, causada pela cirrose biliar secundária a colestase (KARRER & BENSARD, 2000).

O aumento de água do fígado e, conseqüentemente, formação de edema na colestase pode ser explicado por dois mecanismos: 1) a colestase causa desnutrição, com diminuição da produção de ATP, prejudicando a função da ATPase dependente de Na^+ e de K^+, levando ao aumento de Na^+ intracelular, causando o edema intracelular; 2) a colestase causa lesão hepática e, portanto, cirrose que prejudica o metabolismo de aldosterona (secreção elevada), levando ao aumento da reabsorção tubular de Na^+ e assim ao edema tissular (PALMER et al., 1992; ABRAHAM & SCHRIER, 1994; PENA, 1995). A hipoalbuminemia, que foi observada nos animais com colestase, também pode contribuir para a formação do edema na colestase. Em nosso estudo, não foi observada presença de ascite nos animais.

O efeito da dieta GC diminuindo o conteúdo de gordura do fígado nos animais com colestase pode ser explicado pela maior quantidade de fibrose observada nesses animais (ver abaixo). Nos animais sem colestase a dieta SG associou-se a menor conteúdo de gordura do fígado devido ao fornecimento de gordura dessa dieta, mas não pudemos demonstrar diferença significativa na presença de colestase (LSG e LGC).

A colestase associou-se a maior fibrose portal, proliferação ductal, fibrose pericelular, degeneração hidrópica, necrose e mitose, independentemente da dieta. A dieta GC associou-se maior intensidade da fibrose portal e da proliferação ductal nos animais com colestase do que a dieta SG.

A maior intensidade da fibrose portal nos animais com a dieta GC pode ser causada pelo estresse oxidativo, em particular a peroxidação lipídica. Esta pode induzir a síntese de colágeno na colestase experimental (AYKAC et al., 1989; MURIEL & MORENO, 2004) e, dessa forma, produzir fibrose hepática. A gordura de coco foi associada a maior estresse oxidativo do que o óleo de soja em animais sem colestase (OLIVEROS et al., 2004), assim, podemos supor que a dieta com gordura de coco de babaçu agrava a fibrose por esse mecanismo.

Por outro lado, o menor nível de vitamina A nos ratos colestáticos com dieta GC pode também explicar a fibrose mais intensa nesses animais, pois quando há diminuição da vitamina A disponível ocorre estímulo à fibrose. A maior fibrose leva a diminuição das células de Ito (células hepáticas estreladas), que armazenam retinol, e a diminuição de vitamina A estimula a ativação das células de Ito em miofibroblastos, o que intensifica a deposição de fibrose (OHATA et al. 1997; FRIEDMAN, 2000; CHEN & ZHANG, 2003).

A maior proliferação ductal associada à dieta GC pode ser explicada pelo estresse oxidativo causado pela gordura saturada. Em animais com colestase, a ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF-kappaB) ocorreria por ação de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio) (BYUN et al., 2002). O NF-kappaB estimula a transcrição dos genes do TNF-α (LIU, 2005); que por sua vez estimula a proliferação ductal.

Deems et al. (1993) comparando dietas com diferentes proporções de gordura (óleo de açafroa), mostraram que em animais colestáticos a dieta rica em gordura (30% das calorias totais) acompanhou-se de maior fibrose hepática e proliferação ductal do que a dieta pobre em gordura (3% das calorias totais).

Correlação positiva entre a intensidade da fibrose portal e a intensidade da proliferação ductal ocorreu nos dois grupos com colestase. Essa correlação é esperada, pois neste modelo experimental estas duas lesões estão intensamente relacionadas uma com a outra (PINZANI & MILANI, 1998).

No grupo LGC houve também correlação positiva entre a esteatose e a degeneração hidrópica. A degeneração hidrópica está relacionada à retenção de ácidos biliares, que causa lesão dos hepatócitos com destruição das mitocôndrias e assim prejudica o metabolismo das gorduras. No grupo LSG, a freqüência de mitoses correlacionou-se negativamente com a esteatose, sugerindo que quando

existe menor lesão dos hepatócitos (com prejuízo no metabolismo das gorduras) ocorre mais mitose.

Nos dois grupos com colestase houve correlação negativa entre mitose e fibrose pericelular. Isso sugere que quando a lesão do hepatócito é mais intensa e, portanto, há mais fibrose ocorre menos mitose que sugere menos regeneração hepática.

A correlação negativa entre a freqüência de mitoses e a intensidade da proliferação ductal, que ocorreu no grupo LSG, talvez seja explicada pelo desvio para a transformação de células ovais em colangiócitos, diminuindo a transformação de células ovais em hepatócitos. As células ovais (originadas das células tronco) são bipotentes, ou seja, podem dar origem tanto a colangiócitos quanto a hepatócitos (OH et al., 2002; FAUSTO & CAMPBELL, 2003; ZHANG et al., 2003). Embora não haja evidências na literatura, a partir dos nossos resultados podemos sugerir que a transformação num sentido diminua a transformação no outro sentido.

No grupo LSG, a correlação negativa entre a freqüência de mitoses e a intensidade da fibrose portal é justificada pela existência de correlação negativa entre mitoses e proliferação ductal e pela correlação positiva entre fibrose portal e proliferação ductal, já que estas duas lesões estão relacionadas uma com a outra.

Tendo em vista nossos resultados, sugerimos que a cirrose biliar secundária seja tratada com dieta contendo baixo teor de gordura, com suprimento adequado de ácidos graxos essenciais.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A dieta com gordura de coco de babaçu tem efeito hipercolesterolêmico tanto na cirrose biliar secundária como na ausência de cirrose biliar secundária.

- A dieta com baixo teor de óleo de milho evita os efeitos da cirrose biliar secundária sobre a elevação dos níveis séricos de LDL-c, VLDL-c e TG, observada com a dieta com gordura de coco de babaçu.

- A dieta com baixo teor de óleo de milho evita os efeitos da cirrose biliar secundária sobre a diminuição dos níveis séricos de vitamina A.

- A dieta com gordura de coco de babaçu comparada à dieta com baixo teor de óleo de milho diminui o tempo de sono e aumenta a atividade sérica de alanina aminotransferase na ausência de cirrose biliar secundária.

- A dieta com gordura de coco de babaçu comparada à dieta com baixo teor de óleo de milho diminui o conteúdo de gordura do fígado na cirrose biliar secundária e aumenta o conteúdo de gordura do fígado na ausência de cirrose biliar secundária.

- A dieta com gordura de coco de babaçu comparada à dieta com baixo teor de óleo de milho aumenta a intensidade da fibrose portal e a intensidade da proliferação ductal na cirrose biliar secundária. Com ambas as dietas, a intensidade da fibrose portal e a intensidade da proliferação ductal aumentam no mesmo sentido, mas na dieta com gordura de coco de babaçu esse aumento é maior.

- Na dieta com gordura de coco de babaçu a esteatose e a degeneração hidrópica também aumentam no mesmo sentido, enquanto a freqüência de mitoses e a fibrose pericelular aumentam em sentidos opostos.

- Na dieta com baixo teor de óleo de milho a freqüência de mitoses aumenta em sentido oposto da intensidade da fibrose portal, da proliferação ductal, da fibrose pericelular e da esteatose.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDEL-FATTAH, G., FERNANDEZ, M.L., MCNAMARA, D.J. Regulation of very low density lipoprotein apo B metabolism by dietary fat saturation and chain length in the guinea pig. *Lipids*, v.33, p.23-31, 1998.

ABRAHAM, W.T., SCHRIER, R.W. Body fluid volume regulation in health and disease. *Adv. Intern. Med.*, v.39, p.23-47, 1994.

ADACHI, Y., ARII, S., SASAOKI, T., FUNAKI, N., HIGASHITSUJI, H., FUJITA, S., FURUTANI, M., MISE, M., ZHANG, W., TOBE, T. Hepatic macrophage malfunction in rats with obstrutive jaundice and its biological significance. *J. Hepatol.*, v.16, p.171-6, 1992.

AKERBOOM, T. et al. Cholestasis and changes of portal pressure caused by chlorpromazine in the perfused rat liver. *Hepatology*, v.13, p.216-21, 1991.

ALPERS, D.H., CLOUSE, R.E., STENSON, W.F. *Manual of nutrition therapeutics*. Boston: Little Brown, 1983. p.199.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de óleos e gorduras vegetais. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999.

ARRESE, M., YANAN, M.A., SUCHY, F.J. Hepatobiliary transport: molecular mechanisms of development and cholestasis. *Pediatr. Res.*, v.44, p.141-7, 2001.

ASSIMAKOPOULOS SF, VAGIANOS CE, CHARONIS A, NIKOLOPOULOU VN, SCOPA CD. Intestinal failure in obstructive jaundice. *World J. Gastroenterol.*, v.11, p.3806-7, 2005.

AYKAC, G., OZDEMIRLER, G., ALPTEKIN, N., ARICAN, N., OZ, B., UYSAL, M., OZ, H. The hepatic lipid peroxidation, copper and fibrosis in cholestatic rats. *Pharmacol. Res.*, v.21, p.701-6, 1989.

BABAYAN, V.K. Medium-chain triglycerides – Their composition, preparation, and application. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.45, p.23-5, 1968.

BACH, A.C., BABAYAN, V.K. Medium-chain triglycerides: an update. *Am. J. Clin. Nutr.,* v.36, p.950-62, 1982.

---

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP.** São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus.** Washington, 1997. 240p.

BALISTRERI, W.F. Cholestasis. In: BEHRMAN, R.E., KLIEGMAN, R., JENSON, H.B. *Textbook of pediatric*. 16. ed. Philadelphia: Saunders, 2000, p.1203-7.

BALISTRERI, W.F., BOVE, K.E., RYCKMAN, F.C. Biliary atresia and other disorders of the extrahepatic bile ducts. In: SUCHY, F.J., SOKOL, R.J. BALISTRERI, W.F. Liver disase in children. 2 ed. Philadelphia: Lippincott, p.253-74, 2001.

BALISTRERI, W.F., GRAND, R., HOOFNAGLE, J.H., SUCHY, F.J., RYCKMAN, F.C., PERLMUTTER, D.H., SOKOL, R.J. Biliary atresia: current concepts and research direction. *Hepatology*, v.23, p.1682-92, 1996.

BARR, V.A., HUBBARD, A.L. Newly synthesized hepatocyte membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the duct-ligared rat. *Gastroenteroly*, v.105, p.554-571, 1993.

BATTOCHIO, A.P.R., SANTOS, A.G., SILVA, C.R.M., SANTOS, A.R., COELHO, C.A.R. Adaptação do modelo experimental de colestase extra-hepática em ratos jovens. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.19, p.70-73, 2004.

BEATH, S. PEARMAIN, G., KELLY, D., MACMASTER, P., MAYER, A., BUCKEL, J. Liver transplantation in babies and children with extrahepatic biliary atresia: pre-operative condition, complications, survival and outcomo. *J. Pediatr. Surg.,* v.28, p.1044, 1993.

BELL, S.J., MASCIOLI, E.A., BISTRIAN, B.R., BABAYAN, V.K. Alternative lipid sources for enteral and parenteral nutrition: long and medium-chain triglycerides, structured triglycerides, and fish oils. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.91, p.74-8, 1991.

BERG, A.D., GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric linphnodes and the other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect. Immun.*, v.23, p.403-11, 1979.

BERG, C. L., CRAWFORD, J.M., GOLLAN, J.L. Bilirubin Metabolism and the Pathophysiology of Jaundice. In: SCHIFF, E. R., SORRELL, M. F., MADDREY, W. C. *Diseases of the Liver*. 8 ed., Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, 1999. p.147-92.

BERGASA, N.V. & JONES, E.A. The pruritus of cholestasis: potential pathogenic and therapeutic implications of opioids. *Gastroenterology*, v.108, p.1582-8, 1995.

BERGASA, N.V. & JONES, E.A. The prutitus of cholestasis. *Sem. Liver Disease*, v.13, p.319-27, 1993.

BERGASA, N.V.,SABOL, S. L., YOUNG, S. W., KLEINER, D. E., JONES, E. A. Cholestasis is associated with preproencephalin mRNA expression in adult rat liver. *Am. J. Physiol.*; v.268, p. G346-54, 1995.

BERK, P.D., BROWNSTEIN, A.P. Foreword: The Impact of Liver Disease in Children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.35, p.S1, 2002.

BHATHAL, P.S., GALL, J.A. Deletion of hyperplastic biliary epithelial cells by apoptosis following removal of the proliferative stimulus. *Liver*, v.5, p.311-25, 1985.

BLOMHOFF, R., WAKE, K. Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *Faseb J.*, v.5, p.271-7, 1991.

BUCUVALAS, J.C., CUTFIELD, W., HORN, J., SPERLING, M.A., HEUBI, J.E., CAMPAIGNE, B., CHERNAUSEK. S.D. Resistance to the growth promoting and metabolic effects of hormone in children with chronic liver disease. J. *Pediatr.*, v.3, p.397-402, 1990.

BURDELSKI, M. Current concepts in diagnosis and therapy of pediatric liver diseases. *J Hepatol.*, v.23 (suppl), p. 45-8, 1995.

BURSCH, W., PAFFE, S., PUTZ, B., BARTHEL, G., SCHULTE-HERMANN, R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, v.11, p.847-53,1990.

BYUN, M.S., JEON, K.I., CHOI, J.W., SHIM, J.Y., JUE, D.M. Dual effect of oxidative stress on NF-kappakB activation in HeLa cells. *Exp. Mol. Med.*, v.34, p.332-9, 2002.

CAHILL, C.J., PAIN, J.A., BAILEY, M.E. Bile salts, endotoxin and renal function in obstructive jaundice. Surg. Gynecol. Obstet., v.165, p.519-22, 1987.

CAMERON, G.R., OAKLEY, C.L. Ligation of the common bile duct. *J. Pathol. Bact.,* v.35, p.769-99, 1932.

CAMPBELL, M.A., GYORKOS, J., LEECE, B., HOMONKO, K., SAFE, S. The effects of twenty-two organochlorine pesticides as inducers of the hepatic drug-metabolizing enzymes. *Gen. Pharmacol.*, v.14, p.445-54, 1983.

CARAMORI, C.A. Comparação entre dietas com diferentes fontes de gordura quanto aos efeitos sobre a nutrição e a lesão hepática na colestase obstrutiva: estudo experimental em ratos jovens. *Tese de Doutorado.* Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em clínica médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, 2000.

CARDOSO, A.L., PORTA, G., VIEIRA, M.A., CARRAZZA, F.R. Caracterização nutricional de crianças com coletase crônica. *J. Pediatr.*, v.73, p.43-50, 1997.

CARNIELLI, V.P., WATTIMENA, D.J.L., LUIJENDIJK, I.H.T., BOERLAGE, A., DEGENHART, H.J., SAUER, P.J.J. The very low birth premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr. Res.,* v.40, p.169-74, 1996.

CAUDURO, S.M. Atresia biliar extra-hepática: métodos diagnósticos. *J. Pediatr.*, v.79, p.107-14, 2003.

CCAC – CANADIAN COUNCIL OF ANIMAL CARE. *Guide To The Care And Use Of Experimental Animals*. v.2 Ottawa, Ont., p.181, 1984.

CHAPCHAP, P. Atresia das vias biliares e outras alterações dos ductos biliares extra-hepáticos. In: GAYOTTO, L.C.C., ALVES, V.A.F. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001. p.267-81.

CHEN, A., ZHANG, L. The Antioxidant (–)-Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Rat Hepatic Stellate Cell Proliferation in Vitro by Blocking the Tyrosine Phosphorylation and Reducing the Gene Expression of Platelet-derived Growth Factor-β Receptor. *The Journal of Biological Chemistr*, v. 278, p. 23381-89, 2003.

CHIN, S.E., SHEPHERD, R.W., THOMAS, B.J., CLEGHORN, G.J., PATRICK, M.K., WILCOX, J.A., ONG, T.H., LYNCH, S.V., STRONG, R. The nature of malnutrition in children with end-stage liver disease awaiting orthotopic liver transplantation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.56, p.164-8, 1992.

CHUNG-PARK, M., PETRELLI, M., TAVILL, A.S., HALL, P.W., HENOCH, M.S., DAHMS, B.B. Renal lipidosis associated with arteriohepatic dysplasia (Alagille's syndrome). *Clin. Nephrol.*, v.18, p.314-20, 1982.

CLEMENTS, W.D., PARKS, R., ERWIN, P., HALLIDAY, M.I., BARR, J., ROWLANDS, B.J. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut*, v.39, p.587-93, 1996.

COBEA (Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Manual para técnica em bioterismo, 1996.

COELHO, C.A.R. Colestase do recém-nascido e do lactente jovem. *Rev. Paul. Pediatria,* v.13, p.134-6, 1995.

COHEN, M.I., GARTNER, L.M. The use medium-chain triglycerides in the management of biliary atresia. *J. Pediatr.*, v.79, p.379-84, 1971.

COHEN, S.A., SIEGEL, J.H. Biliary disorders in AIDS. *Pract. Gastroenterol.*, v.17, p.10-8, 1993.

COX, C. MANN, J., SUTHERLAND, W., CHISHOLM, A., SKEAFF, M. Effects of coconut oil, butter and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *J. Lipid Res.*, v.36, p.1787-95, 1995.

DAHMS, B.B., BOYD, T., REDLINE, R.W. Severe perinatal liver disease associated with fetal thrombotic vasculopathy. *Pediatr. Dev. Pathol.,* v.5, p.80-5, 2002.

DAVIS, B.H., RAPP, U.R., DAVIDSON, N.O. Retinoic acid and transforming growth factor beta differentially inhibit platelet-derived-growth-factor-induced Ito-cell activation. *Biochem. J.*, v.15, p.43-7, 1991.

DAVIT-SPRAUL, A., COSSON, C., COUTURIER, M., HADCHOUEL, M., LEGRAND, A., LEMONNIER, F., THEROND, P. Standard treatment of alpha-tocopherol in Alagille patients with severe cholestasis is insufficient. *Pediatr. Res.*, v.49, p.232-6, 2001.

DE VRIESE, S.R., SAVELII, J.L., POISSON, J.P., NARCE, M., KERREMANS, I., LEFEBVRE, R., DHOOGE, W.S., DE GREYT, W., CHRISTOPHE, A.B. Fat absorption and metabolism in bile duct ligated rats. *Ann. Nutr. Metab.*, v.45, p.209-16, 2001.

DECSI, T., KOLETZKO, B. Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Acta Paediatr.*, v.395 (suppl), p.31-7, 1994.

DEEMS, R.O., FRIEDMAN, M.I. Macronutrient selection in an animal model of cholestatic liver disease. *Appetite*, v.11, p.73-80, 1988.

DEEMS, R.O., SKYPALA, P.L., HERNANDEZ, A.M., FRIEDMAN, L.S., FRIEDMAN, M.I. Dietary Fat Exacerbates Liver Disease in Bile Duct-Ligated Rats. *J.Nutr.*, v.123, p.1414-1420, 1993.

DEITCH, E.A., SITTIG, K., LI, M., BERG, R., SPECIAN, R.D. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am. J. Surg.*, v.159, p.79-84, 1990.

DENKE, M.A., GRUNDY, S.M. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipid and lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.56, p.895-98, 1992.

DERKX, H.H., HUIBREGTSE, K., TAMINIAU, J.A. The role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in cholestatic infants. *Endoscopy*, v.26, p.724-8, 1994.

DESCOS, B.P., BERRY, S.A., SHARP, H.L., GROSS, C.R., WEISDORF, S.A., PESCOVITZ, O.H. Growth failure in cholestasis rats: the effect of malnutrition on insulin-like growth factor 1. *Pediatr. Res.*, v.26, p.410-4, 1989.

DESMET, V.J. Histopathology of cholestasis. *Verh Dtsch Ges Pathol.*, v.79, p.233-40, 1995.

DONAT, A.E.; POLO, M.B.; VILA, C.J.J.; SANGUESA, N.C.; GARCIA-SALA, V.C.; HERNANDEZ, M.M.; RIBES, K.C. Atresia de vías biliares: estudio clínico retrospectivo. *An. Pediatr. (Barc)*, v.60, p.323-9, 2004.

DORNAUS, C., WALCZAK, S.Z. Suplementação vitamínica em hepatopatias. *Jornal de Pediatria*, v.67, p.122-25, 1991.

ERLINGER, S. Cholestasis. In: SCHIFF, E. R., SORRELL, M. F. & MADDREY, W. C. *Diseases of the liver.* 8.ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 607-29.

ERLINGER, S. Formation of the bile. *Rev. Prat.*, v.41, p.2341-6, 1991.

FAUSTO, N., CAMPBELL, J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.*, v.120, p.117-30, 2003.

FOX, M.R.S., BRIGGS, G.M., Salt mixtures for purified type diets. III – An improved salt mixtures for chicks. *J.Nutr.*, v.72, p.242-50, 1960.

FREY, B., BRAEGGER, C.P., GHELFI, D. Neonatal cholestatic hepatitis from carbamazepine exposure during pregnancy and breast feeding. *Ann. Pharmacother.*, v.36, p.644-7, 2002.

FRIEDMAN S.L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. J*. Biol. Chem.*, v. 275, p. 2247–50, 2000.

GAUDIO, E., ONORI, P., FRANCHITTO, A., PANNARALE, L., ALPINI, G., ALVARO, D. Hepatic microcirculation and cholangiocyte physiopathology. *Ital. J. Anat. Embryol.*, v.110, p.71-5, 2005.

GOUMA, D.J., ROUGHNEEN, P.T., KUMAR, S., MOODY, F.G., ROWLANDS, B.J. Changes in nutritional status associated with obstructive jaundice and biliary drainage in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.44, p.362-69,1986.

GUICCIARDI, M.E., GORES, G.J. Bile acid-mediated hepatocyte apoptosis and cholestatic liver disease. Dig. Liver Dis., v.34, p.387-92, 2002.

HABER, B.A., RUSSO, P. Biliary atresia. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, v.32, p.891-911, 2003.

HAMOSH, M. & SALEM JR., N. Long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biol. Neonate*, v.74, p.106-20, 1998.

HASSEL, C.A., MENSING, E.A., GALLAHER, D.D. Dietary stearic acid reduces plasma and hepatic cholesterol concentrations without increasing bile acid excretion in cholesterol-fed hamsters. *J.Nutr.*, v.127, p.1148-1155, 1997.

HERNDON, J.H. Pathophysiology of pruritus associated with elevated bile acid levels in serum. *Arch. Intern. Med.*, v.130, p.632-7, 1972.

HEYMAN, M.B., SHAPIRO, H.A., THALER, M.M. Endoscopic retrograde cholangiography in the diagnosis of biliary malformations in infants. *Gastrointest. Endosc.*, v.34, p.449-53, 1988.

HIGA, L., STRIBLING, R., MARTIN, P. Evaluation of jaundice. In: BACON, B.R. & DI BISCEGLIE, A.M. *Liver disease: diagnosis & management*. Philadelphia: Churchil Livingstone, p.36-46, 2000.

HOCHMAN, J.A., TREEM, W.R., DOUGHERTY, F., BENTLEY, R.C. Mucolipidosis II (I-cell disease) presenting as neonatal cholestasis. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v.24, p.603-4, 2001.

HOLT, P.R. Competitive inhibition of intestinal bile salt absorption in the rat. *Am J. Physiol.*, v.210, p.635-9, 1966.

HOPKINS, G.J., WEST, C.E. Effect of dietary fats on pentobarbitone-induced sleeping times and hepatic microsomal cytochrome P-450 in rats. *Lipids*, v.11, p.736-40, 1976.

JANSEN, P.L.; MULLER, M. Genetic cholestasis: lessons from the molecular physiology of bile formation. *Can. J. Gastroenterol.*, v.14, p.233-8, 2000.

JEPPESEN, P.B., CHRISTENSEN, M.S., HOY, C-E.,MORTENSEN, P.B. Essential fatty acid deficiency in patients with severe fat malabsorption. *Am. J. Clin. Nutr.,* v.65, p.837-43, 1997.

JOHNSON, R.C., YOUNG, S.K., COTTER, R., LIN, L., ROWE, W.B. Medium-cahin-triglyceride lipid emulsion: metabolism and tissue distribution. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.52, p.502-8, 1990.

KARPEN, S.J. Update on the etiologies and management of neonatal cholestasis. *Clin. Perinatol.*, v.29, p.159-80, 2002.

KARRER, F.M., BENSARD, D.D. Neonatal cholestasis. *Sem. Pediatr. Surg.*, v.9, p.166-69, 2000.

KATZ, S., PESCOVITZ, O.H., GROSFELD, J.L. Growth failure and decreased levels of insulin-like growth factor 1 in obstructive jaundice are reserved by bile diversion. *J. Pediatr. Surg.*, v.26, p.900-3, 1991.

KAUFMAN, S.S., MURRAY, N.D., WOOD, R.P., SHAW JR., B.W., VANDERHOOF, J.A. Nutritional support for the infant with extrahepatic biliary atresia. *J. Pediatr.*, v.110, p.679-86, 1987.

KELLY, D.A. Nutritional and growth in patients with chronic liver disease. *Indian. J. Pedatr.*, v.62, p.533-44, 1995.

KELLY, D.A. Posttransplant failure in children. *Liver Transpl. Surg.*, v.3, p.S32-9, 1997.

KOBASHI, H., YAMAMOTO, K., YOSHIOKA, T., TOMITA, M., TSUJI, T. Nonsuppurative cholangitis is induced in neonatally yhymectomized mice: a possible animal model for primary cirrosis. *Hepatology*, v.19, p.1424-30, 1994.

KOOLS, A.M., STRAKA, J.G., HILL, H.D., WHITMER, D.I., HOLMAN, R.T., BLOOMER, J.R. Modulation of hepatic ferrochelatase activity by dietary manipulation of mitochondrial phospholipid fatty acyl groups. *Hepatology*, v.9, p.557-61, 1989.

KRÄHENBÜHL, S., BRASS, E.P., HOPPEL, C.L. Decreased carnitine biosynthesis in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*, v.31, p.1217-23, 2000.

KRÄHENBÜHL, S., TALOS, C., FISCHER, S., REICHEN, J.. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology*, v.19, p.471-9, 1994.

KRELL H, ENDERLE GJ. Cholestasis: pathophysiology and pathobiochemistry. *Z. Gastroenterol.*, v.31 (Suppl 2), p.11-5, 1993.

KULLAK-UBLICK, G.A., MEIER, P.J. Mechanisms of cholestasis. *Clin. Liver Dis.*, v.4, p.357-85, 2000.

LAI, M-W., CHANG, M-H.; HSU, S-C.; HSU, H-C.; SU, C-T.; KAO, C-L.; LEE, C-Y. Differential Diagnosis of Extrahepatic Biliary Atresia from Neonatal Hepatitis: A Prospective Study. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., v.18, p.121-7, 1994.

LAJOLO, F.M., CAMPOS FRANÇA, M.H., ZUCAS, S.M. Importância da cor da ração no consumo da mesma por ratos (Ratus norvegicus var albinus). *Rev. Fac. Farm. Bioquim .Univ. S. Paulo*, v.7, p.95-103, 1969.

LANSPA, S. J., CHAN, A. T., BELL, J. S. III, GO, V. L. DICKSON, E. R., DiMAGNO, E. P. Pathogenesis os steatorrhea in primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, v.5, p.837-842, 1985.

LEE, M.J., WHITEHOUSE, M.W. Inhibition of electron transport and coupled phosphorylation in liver mitochondria by cholanic (bile) acids and their conjugates. *Biochim. Biophys. Acta*, v.4, p. 317-28, 1965.

LEMONNIER, F., CRESTEIL, D., FENEANT, M., COUTURIER, M., BERNARD, O., ALAGILLE, D. Plasma lipid peroxides in cholestatic children. *Acta Paediatric. Scand.*, v.76, p.928-34, 1987.

LI, M.K., CRAWFORD, J.M. The pathology of cholestasis. *Seminars in Liver Disease*, v.24, p.21-42, 2004.

LINSCHEER, W.G., PATTERSON, J.F., MOORE, E.W., CLERMONT, R.J., ROBINS, S.J., CHALMERS, T.C. Medium and long chain fat absorption in patients with cirrhosis. *J.Clin.Invest.*, v.45, p.1317-25, 1966.

LIU, Z.G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res.*, v.15, p.24-7, 2005.

LUBRANO, R., FREDIANI, T., CITTI, G., CARDI, E., MANNARINO, O., ELLI, M., COZZI, F., GIARDINI, O. Erytrocyte membrane lipid peroxidation before and after vitamin E supplementation in children with cholestasis. *J. Paediatr.*, v.115, p.380-4, 1989.

LUTZ, J., KRAFFT, M.P. Longitudinal studies on the interaction of perfluorochemicals with liver cytochromes P-450 by means of testing the rate of detoxification of pentobarbital. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.411, p.391-4, 1997.

MADDREY, W., VAN THIEL, D.H. Liver transplantation: na overview. *Hepatology*, v.8, p.948-59, 1988.

MADRP – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PESCAS. Decreto-Lei n.º 106/2005. DR n.º 123, I-A Série, de 29.06.2005.

MAZIER, M.J.P., JONES, P.J.H. Diet fat saturation and feeding state modulate rates of cholesterol synthesis in normolipidemic men. *J. Nutr.*, v.127, p.332-340, 1997.

MCKIERNAN, P.J. Neonatal cholestasis. *Semin. Neonatol.*, v.7, p.153-65, 2002.

MEYER, M., SCHRECK, R., BAEUERLE, P.A. H_2O_2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.*, v. 12, p.2005-15, 1993.

†MOUNIE, J., GOUDONNET, H., DUMAS, M., ESCOUSSE, A., TRUCHOT, R. [Nutritional lipidic factors of enzymatic phenobarbital induction in the rat. Effects of quantitative and qualitative composition of dietary lipids (author's transl)]. J. *Pharmacol.*, v.12, p.3-14, 1981.

MOWAT, A.P. Inborn erros of metabolism associated with disordered liver function or hepatomegaly. In: ___. *Liver disorders in childhood*. 2.ed., Londres: Butterworths, 1987. p.166-209.

MOWAT, A.P. *Liver Disordens in Childhood*. 3. ed. London: Butterworth-Heinemann, 1994. p.43-96.

MURIEL, P. High fat diet and liver damage induced by biliary obstruction in the rat. *J.Appl.Toxicol.*, v.15, p.125-8, 1995.

MURIEL, P., MORENO, MG. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.94, p.99-104, 2004.

† Referência original em francês não foi encontrada até a presente data.

NAGASAKA, H., YORIFUJI, T., EGAWA, H., YANAI, H., FUJISAWA, T., KOSUGIYAMA, K., MATSUI, A., HASEGAWA, M., OKADA, T., TAKAYANAGI, M., CHIBA, H., KOBAYASHI, K. Evaluation of risk for atherosclerosis in Alagille syndrome and progressive familial intrahepatic cholestasis: two congenital cholestatic diseases with different lipoprotein metabolisms. *J. Pediatr.*, v.146, p.329-35, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington D.C.; 1996. 125p. 1v. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. National Academy Press.

OCKNER, R.K., PITTMAN, J.P., YAGER, J.L. Differences in the intestinal absorption of saturated and insaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology*, v.62, p.981-992, 1972.

OH, S.H., HATCH, H.M., PETERSEN, B.E. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v.13, p.405-9, 2002.

OHATA, M., LIN, M., SATRE, M., TSUKAMOTO, H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *Am. J. Physiol.*, v.272, p.G589-96, 1997.

OHNUMA, N., TAKAHASHI, T., TANABE, M., YOSHIDA, H., IWAI, J. The role of ERCP in biliary atresia. *Gastrointest. Endosc.*, v.45, p.365-70, 1997.

OHSHIO, G., MANABE, T., TOBE, T., YOSHIOKA, H., HAMASHIMA, Y. Circulating immune complex, endotoxin, and biliary infection in patients with biliary obstruction. *Am. J. Surg.*, v.155, p.343-7, 1988.

OLIVEROS, L.B., VIDELA, A.M., GIMÉNEZ, M.S. Effect of dietary fat saturation on lipid metabolism, arachidonic acid turnover and peritoneal macrophage oxidative stress in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.311-20, 2004.

OTTE, J.B. History of pediatric liver transplantation. Where are we coming from? Where do we stand? *Pediatr. Transplant.*, v.6, p.378-87, 2002.

PADILLO, F.J., ANDICOBERRY, B., NARANJO, A., MIÑO, G., PERA, C., SITGES-SERRA, A. Anorexia and the effect of internal biliary drainage on food intake in patients with obstructive jaundice. *J. Am. Coll. Surg.*, v.192, p.584-90, 2001.

PALMER, B.F., ALPERN, R.J., DONALD, W.S. Pathophysiology of edema formation. In: SELDIN, D.W. *The kidney: physiology and pathophysiology*. 2.ed., New York: Raven Press, 1992. p.2099-2141.

PATEL, .T, GORES, G.J. Inhibition of bile-salt-induced hepatocyte apoptosis by the antioxidant lazaroid U83836E. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.142, p.116-22, 1997.

PENA, J.C. Renal and extra-renal mechanisms of sodium and water retention in cirrhosis. *Rev. Invest. Clin.*, v.47, p.63-79, 1995.

PERLMUTTER, D.H., SHEPHERD, R.W. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype. Hepatology, v.35, p.1297-1304, 2002.

PETTEI, M.J., DAFTARY, S., LEVINE, J.J. Essential fatty acid deficiency associated with the use of a medium-chain-triglyceride infant formula in pediatric hepatobiliary disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.53, p.1217-21, 1991.

PIERRO, A., KOLETZKO, B., CARNIELLI, V., SUPERINA, R.A., ROBERTS, E.A., FILLER, R.M., SMITH, J., HEIM, T. Resting energy expenditure is increased in infants and children with extrahepatic biliary atresia. *J. Pediatr. Surg.*, v.24, p.534-8, 1989.

PINZANI, M., MILANI, S. Cholestasis and fibrosis. In: MANNS, M.P., BOYER, J.L., JANSES, P.L.M., REICHEM, J. Cholestasis liver disease. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.88-99.

POPPER, H. Cholestasis. *Annu Rev Med.*, v.19, p.39-56, 1968.

POUPON, R., CHAZOUILLERES, O., POUPON, R.E. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol.*, v.32 (Suppl), p.29-40, 2000.

PROTHEROE, S.M. Feeding the child with chronic liver disease. *Nutrition*, v.14, p.796-800, 1998.

RAMANATHAN, K., SHILA, S., KUMARAN, S., PANNEERSELVAM, C. Protective role of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced microsomal dysfunctions. *Hum. Exp. Toxicol.*, v.22, p.129-36, 2003.

RAMIREZ, R.O., SOKOL, R.J. Medical management of cholestasis. In: SUCHY, F.J. *Liver disease in children*. St. Louis: Mosby, 1994. p.356-88.

RAMM, G., NAIR, V., BRIDLE, K., SHEPHERD, R., CRAWFORD, D. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *Am. J. Pathol.*, v.153, p.527-35, 1998.

REICHEN, J. & SIMON, F. Cholestasis. In: ARIAS, I.M., BOYER, J.L., FAUSTO, N., JAKOBY, W.B., SCHACHTER, D.A., SHAFRITZ, D.A. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3rd ed. New York, Raven Press, 1994. p.1291-1314.

REICHEN, J. Mechanisms of cholestasis. In: TAVOLONI, N. AND BERK, P.D. *Hepatic transport and bile secretion:* physiology and pathophysiology. New York: Raven Press, 1993. cap.45, p.665-72

REYNOLDS, J.V., MURCHAN, P., LEONARD, N., CLARKE, P., KEANE, F.B., TANNER, W.A. Gut barrier failure in experimental obstructive jaundice. *J. Surg. Res.*, v.62, p.11-6, 1996.

REYNOLDS, J.V., MURCHAN, P., REDMOND, H.P., WATSON, R.W., LEONARD, N., HILL, A., CLARKE, P., MARKS, P., KEANE, F.B., TANNER, W.A. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br. J. Surg.*, v.82, p.534-8, 1995.

ROQUETE, M. L. V. Colestase neonatal. *J. pediatr. (Rio J.)*, v.*76 (Supl), p. S187-S197,* 2000.

ROS, E., GARCIA-PUGES, A. REIXXACH, M., CUSO, E., RODES, J. Fat digestion and exocrine pancreatic function in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, v.87, p.180-187, 1984.

SABESIN, S.M., BERTRAM, P.D., FREEMAN, M.R. Lipoprotein metabolism in liver disease. *Adv. Intern. Med.*, v.25, p.117-46, 1980.

SAKISAKA, S., KOGA, H., SASATOMI, K., MIMURA, Y., KAWAGUCHI, T., TANIKAWA, K. Biliary secretion of endotoxin and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Yale J. Biol. Med., v.70, p.403-8, 1997.

SANTOS, A.R. Efeitos de dietas com baixo e com alto teor de gordura sobre o estado nutricional na colestase obstrutiva: estudo experimental em ratos jovens. *Dissertação de Mestrado.* Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em clínica médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, 2002.

SCHEUER, P.J. *Liver biopsy interpretation.*, London: Ballière Tindall, 1980. p.36-59.

SCHIMD, R. Syntesis and degradation of microsomal hemoproteins. *Drug Metabol. Dispo.*, v.1, p.256, 1973.

SCHÖLMERICH, J., STRAUB, R. Mechanisms of bile salt toxicity. In: LENTZE, M. J., REICHEN, *J. Pediatric cholestasis:* novel aproaches to treatment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. p.83-103.

SCHUPPAN, D., RUEHL, M., SOMASUNDARAM, R., HAHN, E.G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, v.21, p.351-72, 2001.

SCHWIZER, W., BOROVICKA, J., KUNZ, P., FRASER, R., KREISS, C., D'AMATO, M., CRELIER, G., BOESIGER, P., FRIED, M. Role of cholecystokinin in the regulation of liquid gastric emptying and gastric motility in humans: studies whit the CCK antagonist loxiglumide. *Gut*, v.41, p.500-4, 1997.

SENIOR, J.R. The place of medium chain triglycerides. *Am. J. Med. Sci.,* v.257, p.75-80, 1969.

SEWNATH, M.E., LEVELS, H.H., OUDE ELFERINK, R., VAN NOORDEN, C.J., TEN KATE, F.J., VAN DEVENTER, S.J., GOUMA, D.J. Endotoxin-induced mortality in bile duct-ligated rats after administration of reconstituted high-density lipoprotein. *Hepatology*, v.32, p.1289-99, 2000.

SHAH, H.A., SPIVAK, W. Colestase neonatal – Novas abordagens à avaliação diagnóstica e ao tratamento. *Clínicas Pediátricas da América do Norte*, v.5, p.973-95, 1994.

SHEPHERD, R.W. Nutritional support of the child with chronic liver disease. In: SUCHY, F.J. *Liver disease in children*. St. Louis: Mosby, 1994. p.389-400.

SHERLOCK, S., DOOLEY, J. Disease of the liver and biliary system. 11th ed. London: Blackwell Science, 2002. p.19-35.

SHNEIDER, B.L. Progressive intrahepatic cholestasis: Mechanisms, diagnosis and therapy. *Pediatr. Transplant.*, v.8, p.609–12, 2004.

SOKOL, R.J. Fat-soluble vitamins and their importance in patients with cholestatic liver disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.,* v.23, p.673-705, 1994.

SOKOL, R.J. Medical management of neonatal cholestasis. In: BALISTRERI, W.F. et. al. *Pediatric Hepatology*. Philadelphia Publishing, p. 289-308, 1990.

SOKOL, R.J., DEVEREAUX, M., KHANDWALA, R., O'BRIEN, K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, v.17, p.869-81, 1993.

SOKOL, R.J., DEVEREAUX, M., KHANDWALA, R.A. Effect of dietary lipid and vitamin E on mitochondrial lipid peroxidation and hepatic injury in the bile duct-ligated rat. *J. Lipid. Res.*, V.32, P.1349-57, 1991.

SOKOL, R.J., HEUBI, J.E., IANNACCONE, S., BOVE, K.E., BALISTRERI, W.F. Machanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenterology,* v.85, p.1172-82, 1983.

SOKOL, R.J., STRAKA, M.S., DAHL, R., DEVEREAUX, M.W., YERUSHALMI, B., GUMPRICHT, E., ELKINS, N., EVERSON, G. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr. Res.*, v.49, p.519-31, 2001.

SOKOL, R.J., WINKLHOFER-ROOB, B.M., DEVEREAUX, M.W., MCKIM, J.M. Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology,* v.109, p.249-56, 1995.

SOKOL, R.R.J., MACK, C. Etiopathogenesis of biliary atresia. Semin. Liver Dis., v.21, p.517-24, 2001.

SPIVEY, J.R., BRONK, S.F., GORES, G.J. Glycochenodehoxycholate-induced letal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium. *J. Clin. Invest.*, v.92, p.17-24, 1993.

STOLL, M.S. Formation, metabolism, and properties of pyrrole compounds appearing in the gut. In: HEIRWEGH, KPM & BROWN, S.B. *Bilirrubin metabolism*, v.2;. Boca Raton, F.L. CRC Press,.p.103, 1982.

SUCHY, F.J. Approach to the infant with cholestasis. In: SUCHY, F.J., SOKOL, R.J., BALISTRERI, W.F., editors. Liver diseases in children, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001. p. 187-94.

SUNG, J.J., LEUNG, J.C., TSUI, C.P., CHUNG, S.S., LAI, K.N. Biliary IgA secretion in obstructive jaundice: the effects of endoscopic drainage. *Gastrointest. Endosc.*, v.42, p.439-44, 1995.

TAJIRI, H., TANAKA, T., SAWADA, A., ETANI, Y., KOZAIWA, K., MUSHIAKE, S., MISHIRO, S. Three cases with TT virus infection and idiopathic neonatal hepatitis. *Intervirology*, v.44, p.364-9, 2001.

TAKITA, M., IKAWA, S., OGURA, Y. Effect of bile duct ligation on bile acid and cholesterol metabolism in rats. *J. Biochem.*, v.103, p.778-86, 1988.

TATEISHI, T., WATANABE, M., NAKURA, H., TANAKA, M., KUMAI, T., KOBAYASHI, S. Liver damage induced by bile duct ligation affects CYP isoenzymes differently in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, v.82, p.89-92, 1998.

TERAN, J.C. Nutrition and liver diseases. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, v.1, p.335-40, 1999.

TOMAR, B.S. Infantile cholestasis – advances in its understanding: new concepts. *Acta. Paediatr. Taiwan*, v.41, p.6-12, 2000.

UAUY, R., HOFFMAN, D.R., PEIRANO, P., BIRCH, D.G., BIRCH, E.E. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*, v.36, p.885-95, 2001.

USA – DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. *Human Nutrition Information service: Composition of foods. Raw, processed, prepared agriculture handbook*. nº 8 series 1-16. Revised 1976-1986.

VLAHCEVIC, Z.R., HEUMAN, D.M., HYLEMON, P.B. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In: ZAKIM, D.E., BOYER, T.D. *Hepatology – A textbook of liver disease*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p.376-417.

WASSER, S., TAN, C.E. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann. Acad. Med. Singapore.*, v.28, p.109-11, 1999.

WATSON, S., GIACOIA, G.P. Cholestasis in infancy. A review. *Clin. Pediatr. (Phila)*, v.22, p.30-6, 1983.

WELSH, F.K., RAMSDEN, C.W., MACLENNAN, K., SHERIDAN, M.B., BARCLAY, G.R., GUILLOU, P.J., REYNOLDS, J.V. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann. Surg.*, v.227, p.205-12, 1998.

WILLIANS, N.C., DICKSON, R.C. Cholestyramine and medium-chain triglyceride in prolonged management of patients subjects to ideal ressection or bypass. *CMAJ*, v.107, p.626-31, 1972.

YAMASHIRO, Y., SHIMIZU, T., OHTSUKA, Y., NITTONO, H., MIYANO, T., KAWAKAMI, S., HAYASAWA, H. Docosahexaenoic acid status of patients with extrahepatic biliary atresia. *J. Pediatr. Surg.*, v.29, p.1455-8, 1994.

YOON, P.W. ; BRESEE, J.S.; OLNEY, R.S.; JAMES, L.M.; KHOURY, M.J. Epidemiology of Biliary Atresia: A Population-based Study. *Pediatrics*, v.99, p.376-382, 1997.

ZHANG, Y., BAI, X.F., HUANG, C.X. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J. Gastroenterol.*, v.9, p.201-204, 2003.

ZOCK, P.L., De VRIES, H.M., KATAN, M.B. Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein in healthy men and woman. *Arterioscler. Thromb.*, v.14, p.567-75, 1994.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo