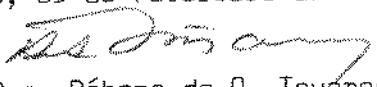


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**INFLUÊNCIA DE DIETAS NORMO E HIPERLIPÍDICAS SOBRE O
PERFIL NUTRICIONAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
SÉRICOS E ESTRUTURAIS DO FÍGADO DE RATOS WISTAR.**
PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por ERNA VOGT DE JONG e aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de fevereiro de 1996.

Campinas, 09 de fevereiro de 1996


Prof. Dra. Débora de Q. Tavares

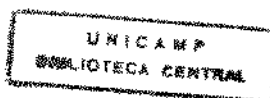
Presidente da Banca

Prof. Dra. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES
Orientadora

ERNA VOGT DE JONG
Médica Veterinária - CRMV1-2164


Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciência da Nutrição.

1996



FOLHA DE APROVAÇÃO

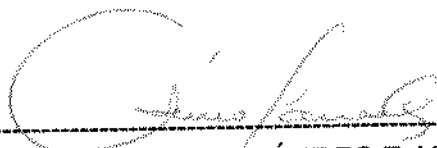
Tese defendida e aprovada , emde fevereiro de 1996, pela banca examinadora
constituída pelos professores:



Profª. Drª. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES
Orientadora



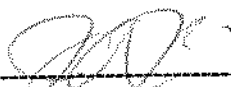
Profª. Drª. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Membro



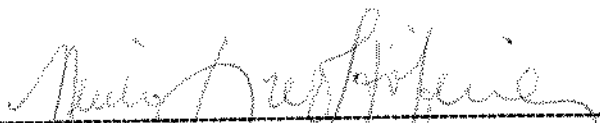
Prof. Dr. ÁUREO T. YAMADA
Membro



Profª. Drª. GLÁUCIA MARIA PASTORE
Membro



Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFAN
Membro



Profª. Drª. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING
Membro



Prof. Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI
Membro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM PESQUISA.....	4
2.1.1. <i>O rato usado como modelo na área de nutrição</i>	4
2.1.2. <i>Uso do modelo animal no metabolismo de lipídios</i>	6
2.2. O FÍGADO.....	8
2.2.1. <i>Morfologia</i>	8
2.2.2. <i>Constituintes celulares do fígado</i>	13
2.2.3. <i>Fisiologia do ponto de vista nutricional</i>	19
2.3. METABOLISMO LIPÍDICO.....	21
2.3.1. <i>Considerações gerais</i>	21
2.3.2. <i>Metabolismo hepático das lipoproteínas</i>	25
2.3.3. <i>Alterações metabólicas</i>	26
2.3.4. <i>Esteatose hepática</i>	28
2.4. EFEITOS DO USO DE TRIACILGLICERÓIS DE CADEIA MÉDIA E DE CADEIA LONGA NA DIETA.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
3.1.1. <i>Primeira etapa</i>	38
3.1.2. <i>Segunda Etapa</i>	40
3.2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	40
3.3. CONTROLE DO PESO CORPORAL E DO CONSUMO DE DIETA.....	47
3.4 - SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS.....	48
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	49
3.5.1. <i>Análises realizadas no soro e no fígado</i>	49

3.5.2. Análises realizadas nas dietas, fezes e urina.....	53
3.5.3. Avaliação da qualidade nutricional das dietas.....	54
3.5.4. Análise estatística.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	56
4.1.1. Ganho de peso e consumo.....	56
4.1.2. CEA, PERop e NPR.....	58
4.1.3. Digestibilidade verdadeira, valor biológico, utilização líquida da proteína e balanço nitrogenado	60
4.1.4. Energia das dietas.....	61
4.1.5. Consumo, excreção, absorção de energia e lipídios.....	62
4.2. EFEITO DA GORDURA INGERIDA NA DIETA SOBRE OS PARÂMETROS SANGUÍNEOS.....	63
4.2.1. Lipídios.....	63
4.2.2. Proteínas totais.....	67
4.2.3. Fosfatase Alcalina.....	68
4.2.4. Glicose.....	69
4.3. RESPOSTA HEPÁTICA AO CONSUMO DE DIFERENTES TIPOS E NÍVEIS DE GORDURA NA DIETA.....	70
4.3.1. Peso do fígado.....	70
4.3.2. Lipídios.....	71
4.3.3. Proteína.....	74
4.3.4. Glicose.....	75
4.3.1. Perfil de ácidos graxos.....	76
4.4. Histologia.....	79
5. DISCUSSÃO.....	94
5.1. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	94
5.1.1. Avaliação ponderal dos animais.....	94
5.1.2. Avaliações de PERop, CEA e NPR.....	96
5.1.3. Avaliação de Dv, VBv e NPUv.....	98
5.1.4. Estimativa do valor energético das dietas.....	98
5.2. PERFIL BIOQUÍMICO DO SANGUE.....	100
5.2.1. Análise dos lipídios séricos.....	100
5.2.2. Fosfatase alcalina.....	102
5.2.3. Glicose e proteínas totais.....	103
5.3. PERFIL BIOQUÍMICO DO FÍGADO.....	104
5.3.1. Lipídios hepáticos.....	104

5.3.2. Perfil dos ácidos graxos hepáticos face a composição dos ácidos graxos consumidos.....	109
5.3.3. Proteínas e glicose nos fígados.....	111
5.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	112
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

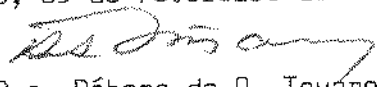
Figura 1. Unidade funcional hepática.	10
Figura 2. Diagrama ilustrativo do processo da linhagem no fígado com respeito ao tamanho da célula	11
Figura 3. Desenho esquemático da estrutura hepática	14
Figura 4. Desenho do esquema experimental da primeira etapa dos ensaios biológicos	42
Figura 5. Desenho do esquema experimental da segunda etapa dos ensaios biológicos	43
Figura 6 - Medida do Ganho de Peso Semanal de ratos Wistar, em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas	58
Figura 7 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato recém desmamado (RD), com 21 dias de idade. Azul Toluidina. 1200 X.	79
Figura 8 - Eletromicrografia do fígado de ratos recém desmamados (RD), com 21 dias de idade; 7245 X	80
Figura 9 - Micrografia de secção histológica de fígado de rato, com 15 dias de ensaio, submetido à dieta CASIN-7/7 (padrão = AIN-93). Azul Toluidina. 480 X.	81
Figura 10 - Micrografia de secção histológica) do fígado de rato com 15 dias de ensaio submetido à dieta 7% de gordura de coco. Azul de Toluidina. 1280 X.	82
Figura 11. Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo dieta com CASIN- 30/30 por 15 dias, mostrando área de aparente normalidade. Azul Toluidina. 1376 X	82
Figura 12 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta (CASIN-30/30) por 15 dias; 9200 X.	83

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**INFLUÊNCIA DE DIETAS NORMO E HIPERLIPÍDICAS SOBRE O
PERFIL NUTRICIONAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
SÉRICOS E ESTRUTURAIS DO FÍGADO DE RATOS WISTAR.**
PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por ERNA VOGT DE JONG e aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de fevereiro de 1996.

Campinas, 09 de fevereiro de 1996


Profa. Dra. Débora de Q. Tavares

Presidente da Banca

Profa. Dra. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES
Orientadora

ERNA VOGT DE JONG
Médica Veterinária - CRMV1-2164

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciência da Nutrição.

1996

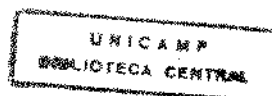


Figura 13 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo (CASSA-30/30) por 15 dias; 172 X.	84
Figura 14 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de gordura de coco (CASSA-30/30) por 15 dias; 23000 X	85
Figura 15 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias; 12600 X.	85
Figura 16- Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias; 14000 X.	86
Figura 17 - Eletromicrografia de uma região do hepatócito de rato sob dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias; 36000 X.	86
Figura 18 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo dieta com 5% de óleo de soja (CASIN-30/5), aos 30 dias do experimento. Azul Toluidina. 480 X.	87
Figura 19 - Eletromicrografia do fígado de rato recuperado de uma dieta contendo 30% de óleo de soja, alimentado com a mesma dieta contendo 5% do óleo (CASIN-30/5). 17200 X.	88
Figura 20 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato recuperado de uma dieta com 30% de gordura de coco, consumindo a mesma dieta com 5% da gordura (CASSA-30/5). 1280 X.	89
Figura 21 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 5% de gordura de coco (CASSA-30/5). 5075 X.	89
Figura 22 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de óleo de soja (CASIN-30/30) por 30 dias; 12600 X.	90
Figura 23 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de gordura de coco (CASSA-30/30) por 30 dias; 12600 X.	90
Figura 24 - Micrografia de secção histológica do fígado de ratos com dieta aprotéica (APROT). Azul Toluidina. 512 X.	91
Figura 25 - Eletromicrografia do fígado de rato alimentado com dieta aprotéica (APROT), 9200 X	92
Figura 26 - Detalhe em eletromicrografia do citoplasma de um fígado de rato sob dieta aprotéica (APROT); 46000 X	92

LISTA DE TABELAS

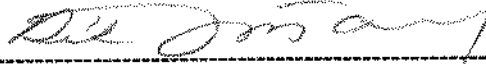
Tabela 1. Funções do fígado	15
Tabela 2.- Modelo do zoneamento funcional (localização predominante das funções) das células parenquimatosas e não parenquimatosas do fígado.	16
Tabela 3 - AIN-93G- Dieta formulada para a fase de crescimento, gestação e lactação de roedores conforme REEVES et al., (1993)	44
Tabela 4 - Quantidade de ácidos graxos determinados, em percentagem, por cromatografia gasosa, nas gorduras utilizadas para formulação das dietas	45
Tabela 5 - Mistura mineral AIN-93G-MX (REEVES et al., 1993) que supre as concentrações de elementos da dieta AIN-93G	46
Tabela 6. Mistura vitamínica AIN-93-VX (REEVES et al., 1993) que supre as necessidades das concentrações de vitaminas da dieta AIN-93G	47
Tabela 7 - Média (\pm Desvio Padrão) do Ganho de Peso e do Consumo de dieta dos ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)	57
Tabela 8 - Média (\pm Desvio Padrão) do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), da Razão da Eficiência Protéica operacional (PERop), da Razão da Eficiência Protéica Líquida (NPR,) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)	59

Tabela 9 - Média (\pm Desvio Padrão) da Digestibilidade Verdadeira (Dv), do Valor Biológico (VB), da Utilização Líquida da Proteína (NPU) e do Balanço Nitrogenado (BN) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)	60
Tabela 10 - Energia das Dietas dos animais experimentais: Determinadas na Bomba Calorimétrica (EBC), Calculadas (EC) em relação a quantidade de nutrientes presentes nas fórmulas, expressa em kcal/100g em percentagem da energia total calculada.	61
Tabela 11 - Média (\pm Desvio Padrão) do Consumo de Energia, de sua Absorção e de Energia Digestível (ED), expressa em kcal, medidos em ratos submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)	62
Tabela 12 - Média (\pm Desvio Padrão) de Consumo de Lipídios, sua Excreção fecal, Cálculo da Digestibilidade Aparente (Da) nos ratos, em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)	64
Tabela 13 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/dL de Lipídios Totais (LT) do soro sanguíneo de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	64
Tabela 14 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/dL de Triacilgliceróis (TAG) do soro sanguíneo de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	66
Tabela 15 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/dL de Colesterol Total (CT) do soro sanguíneo de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	67
Tabela 16 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em g/dL de Proteínas Totais (PT) do soro sanguíneo de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	68

Tabela 17 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em U/L de Fosfatase Alcalina (PA) do soro sanguíneo de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	69
Tabela 18 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/dL de Glicose Plasmática (GP) de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	70
Tabela 19 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em porcentagem do Peso do Fígado relacionada ao peso corporal (PF/PC) de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	71
Tabela 20 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em porcentagem de Lipídios Totais (LT) encontrados no fígado de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	72
Tabela 21 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/g de Triacilgliceróis (TAG) encontrados no fígado de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	73
Tabela 22 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/g de Colesterol Total (CT) encontrado no fígado de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	74
Tabela 23 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em porcentagem de Proteínas Totais (PT) encontradas no fígado de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	75
Tabela 24 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/g de Glicose encontrada no fígado (GF) de ratos em crescimento submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)	76
Tabela 25 - Média (\pm Desvio Padrão) de ácidos graxos, determinados por cromatografia gasosa, em g/100g na gordura do fígado de ratos SPF em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas.	77

FOLHA DE APROVAÇÃO

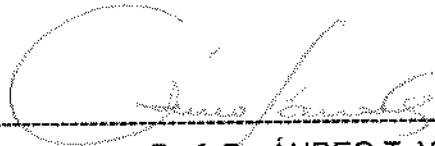
Tese defendida e aprovada, em de fevereiro de 1996, pela banca examinadora constituída pelos professores:



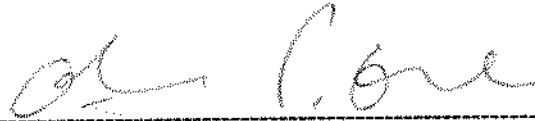
Prof^a. Dr^a. DÉBORA DE QUEIROZ TAVARES
Orientadora



Prof^a. Dr^a. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Membro



Prof. Dr. ÁUREO T. YAMADA
Membro



Prof^a. Dr^a. GLÁUCIA MARIA PASTORE
Membro



Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFAN
Membro



Prof^a. Dr^a. MARIA ALICE DA CRUZ HÖFLING
Membro



Prof. Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI
Membro

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Débora pelo "caminhar junto" através de orientação segura, competente e dedicada; pelo incentivo constante, pela compreensão e sentido humanitário demonstrados durante o curso; pelos conhecimentos e experiência transmitidos.

À Yara pelo eficiente apóio técnico no laboratório, pelos cortes histológicos, pelos serviços fotográficos, pela amizade e companheirismo.

Aos bolsistas de iniciação científica Suzana, Rita e Gunther pela colaboração eficiente e cuidadosa.

Ao corpo docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos e a UFRGS pela concessão de afastamento, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao Programa de Incentivo à Capacitação Docente (PICD/CAPES/MEC), pelo suporte financeiro.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pelas condições de trabalho oferecidas.

Aos funcionários da secretaria, dos laboratórios e do biotério, pelo auxílio prestado em vários momentos.

À Maria José e Valéria, do Laboratório de Patologia Clínica do HC, pela colaboração na leitura das amostras de algumas análises bioquímicas.

Aos Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., pela elaboração e doação do complexo vitamínico AIN-93.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, pelo suporte técnico na Microscopia Eletrônica e pela possibilidade de utilização do laboratório fotográfico.

Ao Francisco, pelo auxílio no cromatógrafo, à Maria Teresa, pelo "layout" final da tese, à Martinha e Chris pelo apóio no computador.

Aos colegas que já estavam no curso, aos que chegaram junto e aos que vieram depois, pela amizade, companheirismo, estímulo e solidariedade.

Ao Gabriel, Maurinho e Eduardo (em ordem de chegada), por me oferecerem uma razão a mais para viver.

Aos familiares e aos amigos do sul, pela compreensão da ausência por quatro anos e aos amigos de Campinas, pela convivência agradável.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para realização deste trabalho.

OBRIGADO

As Tite
Dedico com amor

RESUMO

A manipulação da dieta, especialmente modificação na quantidade de gordura, altera a composição dos lipídios do soro sanguíneo e do fígado. Foi estudado em ratos machos, Wistar (21 dias de idade), alimentados *ad libitum*, o efeito da dieta padrão (AIN-93), cuja fonte protéica foi caseína, associada a 30%, 5% e 7% de óleo de soja (fonte de triacilgliceróis de cadeia longa - TCL), ou à gordura de coco (fonte de triacilgliceróis de cadeia média - TCM), sobre a composição bioquímica do soro sanguíneo e do fígado. Os resultados foram comparados com o desempenho nutricional das dietas e com a morfologia dos hepatócitos.

Os animais foram colocados em gaiolas individuais, sendo pesados a cada 3 dias. Os dados de consumo alimentar foram coletados e, no final de 4 semanas, os índices de avaliação nutricional foram calculados. Nove ratos de cada grupo foram sacrificados no início (T0), no 15º dia (T1) e no 30º dia (T2). Amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e o fígado removido, pesado e preparado histologicamente para microscopia óptica e eletrônica.

Nos grupos alimentados com dietas contendo 30% de lipídios houve redução no consumo da ração, sem perda de peso corporal. Os grupos experimentais alimentados com TCM obtiveram entretanto, menor ganho de peso corporal em todos os níveis de gordura de coco testados, chegando a diferença significativa para o grupo CASSA -30/5 (quinze dias com 30%, 15 dias com 5% de gordura de coco).

O excesso de gordura na dieta foi associado ao acúmulo de lipídio hepático nos ratos e quando o excesso foi reduzido, o processo esteatótico regrediu. Lipídios totais, colesterol e triacilgliceróis (TAG) hepáticos aumentaram nos ratos sob dietas com 30% de óleo de soja. Comparando a dieta AIN-93 com as que continham gordura de coco verificou-se similaridade no nível de colesterol hepático; mas os fígados dos ratos que estavam consumindo 30% de óleo de soja apresentaram nível significativamente mais alto de colesterol.

A composição dos ácidos graxos do fígado refletiu a composição dos ácidos graxos da dieta. Apesar da diferença da razão entre ácido graxo insaturado/saturado das gorduras das dietas (5,93 para óleo de soja e 0,22 para gordura de coco), o resultado de ambas foi similar em alguns aspectos. Houve síntese de ácido palmítico (16:0) e oléico (18:1) no fígado dos animais, independente do tipo de lipídio utilizado na dieta. Ocorreu ainda redução do ácido esteárico (18:0) e do linoléico (18:2) nos grupos de animais alimentados com óleo de soja.

As células do fígado responderam aos estímulos nutricionais com alteração da estrutura e ativação das organelas. A microscopia óptica demonstrou que o acúmulo gradual de gotículas de lipídio nos hepatócitos e o dano celular dependeram da quantidade de gordura ingerida na dieta. Foi possível localizar alguns focos esteatóticos ao redor da região periportal onde algumas células estavam lesadas. A microscopia eletrônica deixou claro que a primeira organela a ser atingida na alteração por esteatose foi a mitocôndria que sofreu perdas das cristas e degeneração interna do tipo mielínico; a segunda alteração foi a vacuolização do retículo endoplasmático rugoso. As demais organelas dos hepatócitos e os limites das células vicinais estavam normais; o espaço de Disse, os canaliculos biliares, as células de Ito e de

Kupffer foram preservadas. A esteatose predominou nas áreas periportais, e a redução de lipídios na dieta favoreceu uma pequena regressão da mesma.

Concluiu-se, face aos resultados obtidos, que a alteração configurada como esteatose hepática seria inespecífica e não dependeria exclusivamente do excesso de lipídios na dieta. A afirmação abrange os fígados de ratos sob dieta aprotéica cuja degeneração foi idêntica, embora muito mais extensiva em relação aos fígados dos ratos sobrecarregados por lipídios na dieta.

ABSTRACT

It is known that manipulation of the diet, particularly of the lipid portion, can alter the serum or liver lipid compositions. The AIN-93 casein diet was associated with soybean oil (source of long-chain triacylglyceride - LCT) or coconut oil (source of medium-chain triacylglyceride - MCT) in an experiment where young males Wistar rats (21 days old) were fed *ad libitum* with diets containing 30%, 5% and 7% soybean oil or coconut oil. The diets had identical nutrient composition except for the type and level of fat.

The animals were placed in individual screen-bottom cages and were weighed and the food consumption calculated every 3 days. At the end of the experiment, various nutritional indices were evaluated. Nine rats from each group were killed at the beginning of the experiment (T0), another group at the 15th (T1) and the last group at the 30th day (T2). Blood samples were collected by cardiac puncture, the livers were removed without delay, weighed and histologically prepared for light and electron microscopy examination.

With the high fat diets, food consumption was reduced but body weight gain did not change: there were no significant differences in body weight among the groups at the end of the experiment. The excess lipid in the diet was associated with increased hepatic lipid accumulation and when the dietary lipid was reduced the steatotic process was also reduced. Liver lipids, cholesterol, and triacylglycerols increased with the 30% soybean oil diet; it was observed with this diet that the quantity of liver cholesterol was significantly higher.

The reference diet (7% of soybean oil in AIN-93) and the coconut oil diet resulted in a similar and normal cholesterol level. The liver cholesterol was highest when rats were fed the 30% soybean oil diet for 30 days. The fatty acids composition of the livers of animals fed LCT or MCT diets were similar, suggesting that under the experimental conditions the variations in quantity or

quality were not enough to impair the metabolic oxidation or the elongation of fatty acid chains.

Furthermore, in spite of the difference in the ratio of unsaturated/saturated fatty acids among the dietary fat (5,93 for soybean and 0,22 for coconut oil), the liver showed similar UFA/SFA lipids. Altogether, an elevation was observed for palmitic (16:0) and oleic acids (18:1), and a reduction for stearic (18:0) and linoleic acids (18:2) among the animals fed soybean oil diets.

Liver histology by optical microscopy demonstrated a gradual accumulation of lipid droplets inside the hepatocytes, whose amount was diet dependent. It was possible to localize some steatosis spots around the periportal region, where several cells would appear damaged. The rate of damage was related to the quantity of lipid in the diet, regardless of its nature.

It became clear by electron microscopy that mitochondria were the first disrupted organelles followed by the impairment of the rough endoplasmic reticulum. The other organelles of the hepatocyte, as well as its boundaries to vicinal cells were always normal; the Disse space was well preserved and so were the biliary canaliculi. The Ito cells were scarce and the Kupffer cells were quiescent. The protein-free diet also provoked hepatic steatosis, identical to the that described above in terms of ultrastructure, but of more extensive.

In general it was verified that lipid droplets inside the hepatocytes were very common starting the 21th day of life; the droplets increased with age even with control groups, being localized free of membranes and sometimes associated with the mitochondria. It was concludes that there is metabolic independence among the hepatocyt because disrruption of one or two cells does not affect the immediate vicinity. A second conclusion was that liver steatosis is not a specific lipid metabolic response, but an intermediate stage of hepatocyte metabolic impairment, regardless its origin.

1. INTRODUÇÃO

O fígado é o órgão chave do metabolismo e seu complexo mecanismo bioquímico necessita de suprimento adequado de nutrientes para manter a integridade estrutural e funções normais. Portanto, quando o alimento ingerido é de baixa qualidade ou em quantidade insuficiente poderá ocorrer desequilíbrio nutricional (NAYAK, 1987).

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos é manifestação comum em diferentes situações metabólicas ou condições patológicas. Alterações crônicas do fígado podem induzir esteatose e aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres que são atribuídos à utilização deficiente da gordura. Geralmente o acúmulo de triacilgliceróis (TAG) é o resultado do desequilíbrio entre a taxa de síntese e de sua liberação pelos hepatócitos (DIANZANI, 1978). Para CHURCH & POND (1988) existe ao redor de 5% de lipídios no peso úmido normal do fígado que, em condições anormais ou patológicas, podem atingir até 30%.

TSUKAMOTO et al. (1985) trabalhando com infusão contínua de etanol e baixa quantidade de lipídios na dieta encontraram esteatose severa na avaliação histológica confirmada pela quantificação de TAG no fígado. Mas GOHEEN et. al. (1983) já haviam concluído que ocorria severa esteatose nos dois extremos dietários, isto é, na ausência ou com níveis elevados de lipídios na dieta. Em 1980, os mesmos autores, estudando a origem dos TAG, que contribuíam para o fígado gorduroso dos alcoolizados crônicos, concluíram que eles poderiam ser decorrentes da dieta, dos ácidos graxos liberados pelo

tecido adiposo ou do aumento da síntese de ácidos graxos. Notaram também que o nível reduzido do ácido araquidônico da dieta poderia estar diminuindo a mobilização da gordura hepática. A possível explicação para este fato segundo NAKAMURA et. al. (1992) foi o decréscimo de enzimas hepáticas e a troca do ácido araquidônico, das frações lipídicas, por outros tipos de ácidos graxos. Outro mecanismo, para o desenvolvimento do fígado gorduroso no alcoolismo, seria o aumento da taxa de peroxidação de lipídios nos hepatócitos com o aumento do malonaldeído e decréscimo da glutathione peroxidase (KOCH et. al., 1991).

O Kwashiorkor é o exemplo clássico da síndrome de deficiência protéica na dieta humana onde é característico o fígado gorduroso, a hepatomegalia, o edema generalizado e toda uma série de anomalias de pele e fâneros. Foi demonstrado em ratos, por MILNER & PERKINS (1978), que a deficiência de arginina produzia esteatose e hepatomegalia com alteração dramática na composição dos lipídios hepáticos e a elevação do colesterol sérico foi proporcional ao acúmulo de lipídios.

HAGVE et. al. (1991) relataram um caso de esteatose onde o nível de apolipoproteína B-100 estava 8% abaixo do nível normal enquanto a B-48 estava em nível ótimo. Eles propuseram que o quadro seria decorrente de um defeito nas células secretoras de apolipoproteínas do fígado e que a diminuição da B-100 poderia ser a causa de esteatoses idiopáticas.

O fígado tem outro papel importante nas alterações de concentração de lipoproteínas. Na obesidade ele produz quantidades aumentadas de "Very Low Density Lipoprotein" (VLDL) e apolipoproteína B (ANDERSEN, 1992).

A deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) produz marcante alteração no nível e composição da "High Density Lipoprotein" (HDL) e VLDL (SANO & PRIVETT, 1980). Entretanto a presença dos AGE em níveis normais

inibe a síntese exagerada de ácidos graxos no fígado de ratos independente da quantidade de hidrato de carbono ingerido (CLARKE et. al., 1977b). E ainda, inibe a Acil-CoA:1,2 diacilglicerol O-aciltransferase que é importante para a redução da síntese e secreção de triacilglicerol (RUSTAN et. al. ,1988).

Esteatose que resulta de altos níveis de gordura na dieta , acima de 50% da energia como lipídios, causa uma deposição direta de ácidos graxos exógenos nos hepatócitos (MARTINS et. al., 1984; QUIGLEY et al., 1993). A hiperalimentação também tem sido relacionada com a disfunção hepática e com a esteatose (KAMINSKY et. al., 1980; CHANG & SILVIS, 1974). Para QUIGLEY et al. (1993) a hiperalimentação está mais ligada com patologias relacionadas ao nível anormal de enzimas do fígado.

No presente estudo abordamos as alterações hepáticas de origem nutricional, focalizando o desequilíbrio energia/proteína obtidos por manipulação dos lipídios dietários. Ratos Wistar, Specific Pathogen Free (SPF), em crescimento, foram submetidos a dietas hiperlipídicas com triacilgliceróis de cadeia longa e média. Após 15 dias a gordura do alimento foi reduzida para confirmar a regressão do depósito de gordura hepática. A formação e acúmulo de lipídios foi investigada por microscopia óptica e eletrônica, em combinação com análises bioquímicas da composição lipídica do soro, de homogeneizado do fígado, e relacionada com a curva de crescimento.

O estudo proposto foi consequência de trabalhos anteriores do LMA (Laboratório de Microestrutura de Alimentos), quando VIEIRA (1992) iniciou as necessidades nutricionais da linhagem Wistar e NORONHA (1994) verificou alterações hepáticas ao utilizar dietas com altas concentrações de proteínas e lipídios.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Uso de animais de laboratório em pesquisa.

Os animais de laboratório, por questões éticas ou econômicas, têm sido usados na explicação de fenômenos que afetam condições humanas. Tal fato se observa em pesquisas para o desenvolvimento científico, na área de análises de produtos químicos e contaminantes ambientais, controle e desenvolvimento farmacológico, área biomédica e estudo de alimentos (MENEDEZ, 1985).

Animais como camundongos, ratos, cobaias, aves, coelhos e outros vertebrados são usados em pesquisas, entretanto ratos ocupam posição dominante na área de nutrição (YANG & MICKLSEN, 1974), especialmente para o estudo do metabolismo de lipídios (SUCKLING & JACKSON, 1993), sais minerais (ECELBARGER & GREGER, 1991; GREGER 1992), proteína (AOYAMA et al., 1992a) e doenças nutricionais (MEZEY, 1978).

2.1.1. O rato usado como modelo na área de nutrição.

Animais de laboratório têm contribuído de maneira importante para determinar os requerimentos nutricionais e o tipo de alimentação do homem. Em pesquisas na área de nutrição, há necessidade do estabelecimento de critérios para seleção destes animais. O primeiro deles é a espécie do animal usado e a sua aplicabilidade aos problemas para os quais as respostas

devem ser obtidas e suas alternativas potenciais. Para BARTH & PFEUFFER (1988), como os coelhos são mais sensíveis à redução de lipídios séricos do que os ratos, devem ser os animais de eleição para estes estudos. Só alguns primatas, cobaias, morcegos e alguns peixes não sintetizam o ácido ascórbico, então só estes animais podem ser utilizados para estudar dietas com deficiência neste nutriente (YANG & MICKLSEN, 1974).

Outro aspecto relevante é a taxa de crescimento, pois quando pretende-se extrapolar dados deve-se lembrar que, as crianças ganham peso mais lentamente e requerem mais baixa taxa de concentração de nutrientes do que a maioria dos animais de laboratório (NRC, 1978; ANDRIGUETO et al., 1990). Então qualquer escolha, em pesquisa de nutrição, deve levar em conta o estágio de desenvolvimento dos animais e a taxa de crescimento comparada aos humanos. Deve-se ainda considerar fecundidade, variabilidade da espécie, manejo, transporte e fator econômico.

A busca do modelo adequado tem gerado controvérsias, embora informações obtidas com animais sejam usadas na aplicação inicial das pesquisas de nutrição humana. Os pesquisadores decidem de acordo com o tipo disponível, espécie adequada, número de variáveis em estudo, nível biológico e bioquímico da experimentação, custo, sensibilidade animal à resposta imune, doenças, drogas, presença ou ausência de nutrientes e antimetabólitos, e outros. (ROGERS & NEWBERNE, 1973.)

Vários animais de laboratório têm sido utilizados como modelos no estudo de diversos problemas nutricionais. No entanto, para WADDELL & DESAI (1981), o rato ocupa uma posição dominante devido às vantagens de sua utilização como tamanho, fácil manejo, fecundidade, baixo consumo, resistência a doenças e custo de manutenção.

Limitações para o uso do rato, como modelo experimental para nutrição humana, incluem as diferenças na quantidade de alimento ingerido, gasto de energia, tamanho corporal, distribuição do colesterol HDL-LDL, coprofagia, falta de fechamento da placa endocondrial, entre outros. Entretanto o metabolismo dos minerais é similar em humanos e ratos.

Os ratos são fisiologicamente semelhantes a outros animais monogástricos exceto por terem pâncreas difuso e não possuem vesícula biliar. Do fígado partem diretamente para o duodeno três ductos responsáveis pelo transporte dos sais biliares. Requerem temperatura ambiente entre 20-24°C, umidade relativa entre 40-60% e 12 horas de luz. As fêmeas estão aptas para a reprodução a partir de 80-100 dias de vida; o período de gestação é de 21 dias e o tamanho da ninhada varia de 06 a 12 filhotes que são desmamados aos 21 dias, iniciando a ingestão de alimento sólido aos 12 dias de idade (BAKER et al., 1979; HARKNESS, 1993).

2.1.2. Uso do modelo animal no metabolismo de lipídios.

Para SUCKLING & JACKSON (1993), o principal modelo adotado para estudo do metabolismo lipídico é o rato. A maioria das pesquisas em metabolismo lipídico visa a determinação do perfil das lipoproteínas plasmáticas. Entretanto na maioria dos animais de laboratório, a proteína presente em maior quantidade no plasma é a HDL (High Density Lipoprotein) enquanto que no homem é a LDL (Low Density Lipoprotein). Outra diferença é a maior quantidade e atividade da enzima éster colesterolil transferase que transfere o éster do colesterol da HDL para a LDL.

O hepatócito capta através de receptores de membranas específicos a LDL plasmática e esta atividade de captação pode ser alterada durante o uso de drogas ou por manipulação da dieta. No rato, além do receptor hepático de

LDL ser pouco sensível (SPADY et al., 1986; SHILLABEER et al., 1990) , a quantidade da gordura saturada ou insaturada presentes no plasma também regula o processo de captação da HDL de forma distinta (WOOLLETT et al., 1992).

A maioria das rotas de síntese ou de oxidação e os mecanismos de transporte de lipídios através dos tecidos são conhecidos. Há controvérsias quanto ao aspecto da regulação hormonal na integração do metabolismo entre os tecidos, ao efeito das dietas e drogas e mais especificamente nas mudanças do metabolismo lipídico que ocorrem em doenças. O rato é capaz de modular a síntese de colesterol hepático, como primeira resposta ao uso de drogas seqüestrante de ácidos biliares e inibidores da enzima hidroximetil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, mas, na linhagem de ratos corpulentos JCR:LA, pode ser induzido à hiperlipidemia e à aterosclerose (VANCE & RUSSEL, 1990). É de fundamental importância portanto o conhecimento da genética e das características bioquímicas da linhagem a ser usada no experimento.

O metabolismo lipídico do rato foi estudado por vários pesquisadores. CLARKE et al. (1977a) e BEVERLEY & ARTHUR (1988) observaram o efeito da ingesta de ácidos graxos no fígado; YOSHIDA & KURYAMA (1990), VERNON (1992) e GOHEEN et al. (1980 e 1983) verificaram o efeito do consumo de ácidos graxos na lipogênese e HEVIA et al. (1980), HERMAN et al. (1991), HORIGOME & CHO (1992), MONSMA & NEY (1993) trabalharam com a influência da composição das dietas na concentração de lipídios no soro e/ou no fígado.

2.2. O fígado

Uma manifestação da função anormal do fígado é o acúmulo de lipídios que ocorre pela elevação da lipogênese, devido por exemplo ao excessivo consumo de hidrato de carbono. Concorre também para esta elevação o aumento da taxa de mobilização dos lipídios do tecido adiposo para o fígado (por exemplo: diabetes mellitus, jejum, hipoglicemia e fatores hormonais). Finalmente o aumento do acúmulo de lipídios ocorre devido ao decréscimo do transporte de lipídios para outros tecidos, por exemplo na deficiência de colina, de ácido pantotênico, de inositol, de proteína ou de certos aminoácidos ou de outros nutrientes específicos, (CHURCH & POND, 1988). Assim como a deficiência da ingestão de dieta (MEZEY, 1978), a hiperalimentação também tem sido relacionada com disfunção hepática apresentando evidências morfológicas de esteatose (CHANG & SILVIS, 1974, KAMINSKI et al., 1980) sendo que para QUIGLEY et al. (1993) a hiperalimentação está relacionada mais freqüentemente com patologia enzimática do fígado.

A função bioquímica do hepatócito humano difere da função do hepatócito do rato, do camundongo e de outros animais. Os primatas seriam os melhores modelos experimentais para o estudo de patogenias hepáticas, sobretudo nos quadros de doenças nutricionais (HAZELL et al., 1992).

2.2.1. Morfologia.

O fígado do rato é dividido em quatro lobos: o mediano, o lateral direito, o caudal e o cranial. A fissura profunda do mediano auxilia sua identificação assim como a do lateral direito que é parcialmente dividido em porção caudal e cranial. O caudal caracteriza-se por pequeno e também por estar encaixado ao redor do esôfago. O rato não possui vesícula biliar e os ductos de cada

lóbulo juntam-se para formar o colédoco que chega ao duodeno a mais ou menos 25 mm do esfíncter pilórico. Os ductos não têm capacidade de armazenar bile pelo seu pequeno tamanho e carência de tónus do esfíncter de Oddi (BAKER et al., 1979) .

A forma clássica para apresentar a unidade hepática funcional está baseada na configuração do fígado do porco que apresenta inúmeros prismas hexagonais e paralelos delimitados por tecido conjuntivo. Em corte transversal este modelo apresentaria numerosos polígonos hexagonais. Cada vértice de um polígono compartilha um espaço porta com os vértices de outros polígonos vizinhos. Neste espaço porta corre um ramo da veia porta, ramos da artéria hepática, vasos linfáticos e ramos dos ductos bilíferos. O centro do hexágono é ocupado por um vaso solitário chamado Veia Centrolobular. Pode-se considerar este prisma hexagonal como uma unidade funcional e para fazê-lo deve-se recorrer a descrição da circulação sanguínea para o interior do mesmo (Figura 1 - Compilada de REID et al., 1992).

O sangue venoso e arterial flui respectivamente a partir das vênulas do sistema portal e das arteríolas dos sistema arterial, penetram as placas de hepatócitos misturando-se no sistema de sinusóides do fígado, fornecendo a máxima intimidade do sangue com as células hepáticas.

As diversas zonas do fígado podem apresentar diferentes funções. As células da zona periportal participam da glicólise anaeróbica, enquanto as da área centrolobular são particularmente importantes no metabolismo aeróbico dos hidratos de carbono. Os hepatócitos perfazem cerca de 60% do peso do fígado e tem vida média de 191 a 453 dias (SASSE et al. 1992).

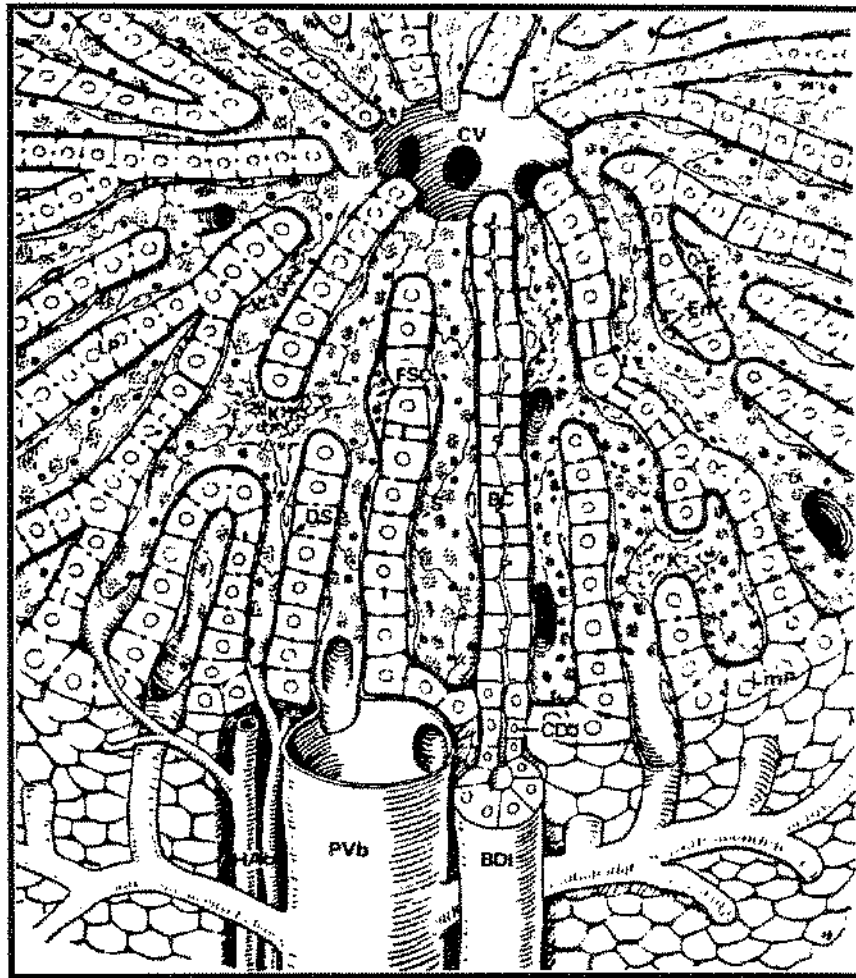


Figura 1. Unidade funcional hepática. CV = veia central; K = célula de Kupffer; FCS = célula estocadora de gordura (célula Ito); BC = canaliculo biliar; En = célula endotelial; S = sinusóide; DS = espaço de Disse; HAb = ramo da artéria hepática; PVb = ramo da veia porta; CDJ = canaliculo da junção do ducto (canal de Hering); BDI = ducto biliar; LmP = lâmina limitante; LP = lâmina do fígado.

RAPPAPORT (1963) descreveu a estrutura acinar do fígado que consiste na disposição de parte do parênquima ao redor de um eixo central, formado por um ramo da veia porta, uma arteríola hepática terminal, ducto biliar, vasos linfáticos e ramificações nervosas associados a tecido conjuntivo e considerou a área circundada por pelo menos quatro espaços portais como

um ácino funcional. Este interessante modelo foi recuperado por REID et al. (1992) quando propõe para explicar o modelo final da microcirculação: "O ácino é dividido em três zonas: zona 1, da região periportal; zona 2, da região mediana do ácino e zona 3, a região que rodeia a veia centrolobular ou seja a vênula terminal hepática." Como consequência desta regionalização vascular os hepatócitos e demais células terão formas e funções diferenciadas.

Na Figura 2, compilada de REID et al. (1992), apresentamos um modelo do esquema que aborda a evolução do hepatócito ao longo da trabécula e a evolução da matriz extracelular que os acompanha. As células pequenas localizadas entre a lâmina parenquimatosa e os ductos biliares são consideradas as precursoras. A diferenciação pode seguir dois caminhos: na direção do ducto biliar ou na direção dos hepatócitos.

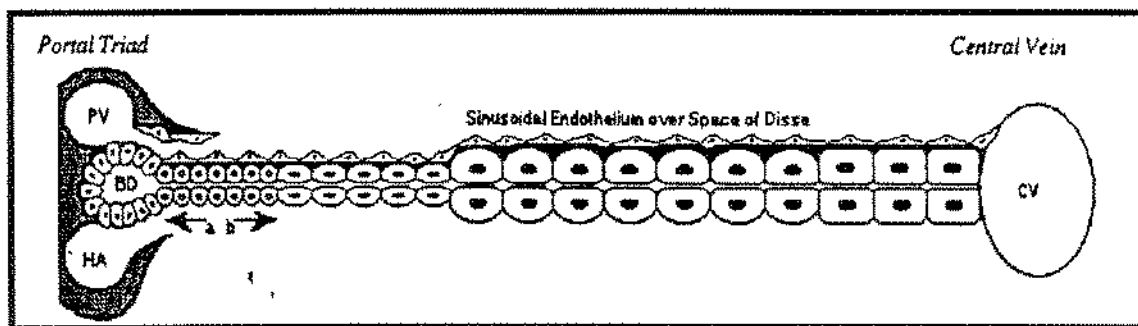


Figura 2. Diagrama ilustrativo do processo da linhagem no fígado com respeito ao tamanho da célula. a = diferenciação em direção ao ducto biliar; b = diferenciação em direção aos hepatócitos; PV = veia porta; BD = ducto biliar; HA = artéria hepática; CV = veia central.

O hepatócito apresenta forma relativamente prismática onde pelo menos duas de suas faces são adjacentes aos sinusóides e as outras se relacionam com os canalículos biliares ou estão em contato com a face da célula vizinha. O hepatócito apresenta numerosas microvilosidades com forte atividade enzimática confirmando o papel ativo da membrana na secreção e

absorção. Na face de contato com o hepatócito vizinho a superfície da membrana é relativamente lisa com poucas digitações e cavidades.

Em condições de anoxia a parede sinusoidal torna-se mais permeável ao plasma, os sinusóides estreitam-se e os espaços de Disse dilatam-se. Os espaços de Disse são considerados verdadeiros vasos linfáticos que drenam a linfa para os espaços porta, onde se acumula, sendo filtrada através do tecido conjuntivo e vai para os vasos linfáticos mais calibrosos (BARROS COELHO, 1971).

Nos cortes histológicos o citoplasma do hepatócito não é homogêneo contendo grânulos e vacúolos. Na desnutrição verifica-se a depleção de vários constituintes citoplasmáticos incluindo água, gordura, proteínas e enzimas. Em condições normais as células hepáticas armazenam glicogênio em quantidades variadas com a dieta, com o estado nutricional, com o sexo e com a espécie animal (CAMARGO et al., 1978). Nos cortes histológicos do material fixado com fixadores alcoólicos, o glicogênio aparece em forma de grânulos; após fixação em formolaldeído mostram um aspecto esponjoso ou finamente reticular.

As mitocôndrias hepáticas são esféricas ou oblongas e obviamente são a sede da respiração celular. Grande número de processos que liberam energia ocorrem no seu interior particularmente os que envolvem fosforilação oxidativa. A síntese de glicogênio também ocorre nas mitocôndrias. A alteração mais frequente da mitocôndria é o entumescimento, que indica alteração funcional e prossegue com o desaparecimento das cristas mitocondriais. É uma alteração reversível e ocorre em várias condições como a anóxia e intoxicações variadas. A lesão inicial da mitocôndria ocorre na membrana interna com aumento da permeabilidade e posterior interferência

no ciclo de Krebs. A alteração torna-se irreversível na falta de fatores energéticos (BARROS COELHO, 1971).

2.2.2. Constituintes celulares do fígado

O tecido hepático funciona integralmente com cinco tipos celulares (Figura 3, compilada de SASSE et al., 1992): o hepatócito, a célula endotelial, a célula de Kupffer, a célula perisinusoidal e os grandes linfócitos granulares ("Pit Cells").

O hepatócito é a célula que tem mais funções no organismo e esta diversidade funcional é refletida em sua estrutura. As principais funções hepáticas foram resumidas por JUNGERMANN (1992) e são apresentadas na Tabela 1. O mesmo autor propõe ainda (Tabela 2) um modelo que mostra a heterogeneidade funcional dos hepatócitos.

Segundo REID et al. (1992), as bases para interpretação dos aspectos das estruturas funcionais no campo da microcirculação e histoquímica são os ácinos, organizados ao redor de dois leitos vasculares, e os espaços porta. E para propósitos histoquímicos e patológicos, o termo periportal (ao redor do espaço porta), perivenoso (ao redor da veia centrolobular) e intermediário permitem uma exata localização intra-parenquimatosa (SASSE et al., 1992; REID et al., 1992). Enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, remoção de amônia e transporte de ácidos graxos sódio dependentes são evidências, para GUMUCIO (1989), da heterogeneidade intralobular das células do parênquima hepático

Para JUNGERMANN & KATZ (1989) o gradiente de oxigênio mudando a concentração química e a disponibilidade dos mediadores junto aos sinusóides são importantes para estabelecer o zoneamento da heterogeneidade do parênquima. Os hepatócitos periportais e perivenosos

possuem diferentes quantidades e tipos de enzimas com capacidades metabólicas diversas. O processo de síntese de ácidos graxos ocorre predominantemente nos hepatócitos perivenosos enquanto as células periportais catalisam a oxidação dos ácidos graxos, de aminoácidos bem como a liberação da glicose (QUISTORFF et al. 1992).

No fígado os ácidos graxos são utilizados para produção de energia, na cetogênese e para síntese de triacilgliceróis. Em 1989, JUNGERMANN & KATZ já haviam concluído que a degradação dos ácidos graxos estava localizada na zona periportal pela presença de alta concentração de várias enzimas envolvidas na β -oxidação.

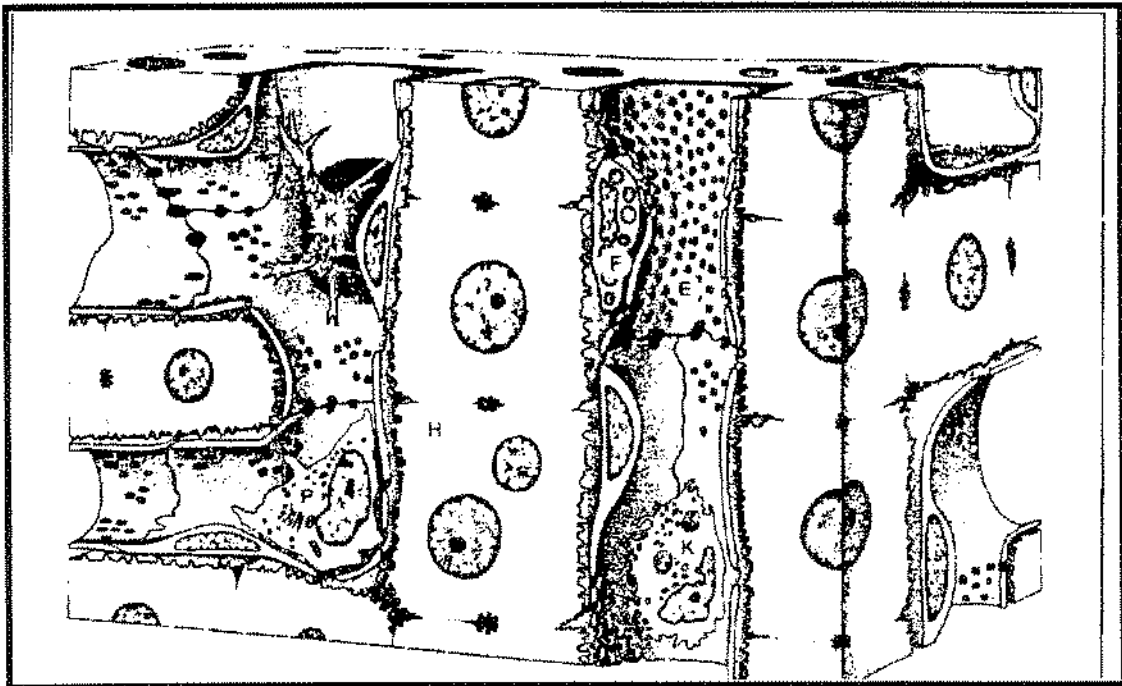


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura hepática. H = hepatócito; E = célula endotelial; K = célula de Kupffer; F = célula estocadora de gordura; P = célula Pit.

Tabela 1. Funções do fígado

1. Centro do metabolismo

Fornecimento de energia para o corpo

Captação e liberação de glicose

Produção de corpos cetônicos

Produção de uréia

Captação e liberação de aminoácidos

Processamento de lipídios

Biossíntese e biodegradação

Síntese e degradação de proteínas plasmáticas

Formação de bile

2. Centro de defesa

Metabolismo de xenobióticos

Fagocitose e eliminação bioquímica de moléculas estranhas
e agregados macromoleculares

Eliminação de células tumorais

3. Posto de controle do sistema hormonal

Inativação e eliminação de hormônios e mediadores

Síntese e liberação de (pro) hormônios e mediadores

4. Reservatório de sangue

Estoque de sangue ativo

Estoque de sangue passivo

Tabela 2. Modelo do zoneamento funcional (localização predominante das funções) das células parenquimatosas e não parenquimatosas do fígado.

<i>Zona Periportal</i>	<i>Zona Perivenosa</i>
Células parenquimatosas	
Metabolismo energético oxidativo	
Oxidação dos ácidos graxos	
Liberação de glicose	Captação de glicose
Gliconeogênese	Glicólise
Síntese de glicogênio do piruvato	Síntese de glicogênio da glicose
Glicogênio para glicose	Glicogênio para piruvato
	Lipogênese
Metabolismo de aminoácidos e amônia	
Formação de uréia do N dos aminoácidos	Glutamina
Formação de uréia de NH ₃ e glutamina	Formação do NH ₃
Conversão de aminoácido em glicose	
Síntese de colesterol	
<i>Formação de bile</i>	
Metabolismo protetor	
Peroxidação da glutationa	<i>Metabolismo de xenobióticos</i>
Conjugação de glutationa	Mono-oxigenação
Formação das Proteínas Plasmáticas	
Albumina	α -Fetoproteína
α 2-Macroglobulina	Angiotensinogênio
Fibrinogênio	α 1-Antitripsina
Células não parenquimatosas	
Células endoteliais	
Ligação de lectina	Permeabilidade
	<i>Células de Kupffer</i>
Fagocitose	Citotoxicidade
	<i>Células perisinusoidais</i>
Formação de matriz extracelular	
Estoque de lipídios	

A concentração de carnitina palmitoiltransferase, responsável pelo transporte mitocondrial de ácidos graxos, a produção de gás carbônico pela degradação oxidativa e a cetogênese na ausência de glucagon, encontradas por TOSH et al. (1988) e GUZMAN & CASTRO (1989), foram mais elevadas na área periportal, portanto antecedem e reforçaram as conclusões de JUNGEMANN & KATZ (1989).

As células do fígado sofrem alterações em suas estruturas e conteúdo de organelas em resposta a numerosos estímulos. GEERTS et al. (1991) injetando CCl₄ por via intraperitoneal, observou maior proliferação de células estocadoras de gordura ("fat-storing cells") no fígado de ratos, onde posteriormente ocorreria fibrinogênese, sugerindo que estas células estariam envolvidas na formação da matriz extracelular.

Em pesquisa recente, MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA (1993) confirmaram os dados encontrados pelo primeiro autor em 1984, de que as células do lóbulo do fígado não possuem membrana basal mas apenas uma delgada matriz extracelular hepática que configura o espaço de Disse. Esta configuração junto com as abundantes fenestrações (WISSE et al., 1985) e fendas nas células endoteliais sinusoidais servem para facilitar a rápida troca bidirecional de macromoléculas que ocorre entre o plasma e os hepatócitos. A interação entre a matriz extracelular e as células do fígado é essencial para a homeostase hepática. Embora a matriz extracelular seja apenas um componente menor do fígado é essencial na manutenção da estrutura dos hepatócitos. WISSE et al. (1985) e McGUIRE et al. (1992) demonstraram que o tamanho, número e morfologia das fenestrações do endotélio das células hepáticas são regulados pela matriz extracelular.

Em 1985 WISSE et al., concluíram que o diâmetro e a frequência das fenestrações da célula endotelial da área periportal diferiam dos da área

centrolobular do ácino do fígado. Relataram ainda que ratos possuem estas fenestrações em diâmetro maior facilitando a remoção do colesterol remanescente da circulação, impedindo o depósito de gordura nas paredes vasculares. Uma vez que a entrada de gordura no espaço de Disse ocorre em pequenas partículas, o aumento dos poros pode contribuir para a admissão de gordura da dieta nos hepatócitos promovendo a esteatose.

FRASER et al., (1995) descreveram as fenestrações típicas do endotélio sinusoidal hepático como um biofiltro dinâmico, em forma de peneira, que atua como barreira impedindo macromoléculas, especialmente lipoproteínas, de entrarem no espaço de Disse. Este é o primeiro local de seleção hepática e conseqüente metabolismo do colesterol e vitaminas lipossolúveis da dieta. No mesmo ano, BRAET et al. relacionaram as fenestrações do endotélio das células sinusoidais do fígado de ratos com o citoesqueleto. As fenestrações do endotélio seriam rodeadas e delineadas por microtúbulos formando uma rede junto com os elementos do citoesqueleto. E esta seria uma estrutura dinâmica que atua na manutenção e regulação do tamanho das fenestrações, controladora da importante função hepática de filtro endotelial.

Encaminhando o enfoque para as células não parenquimatosas do fígado, o primeiro destaque será dado às células dos sinusóides. BOUWENS et al. (1992) relataram que os sinusóides hepáticos normais são formados por quatro diferentes tipos de células, cada uma com suas características fenotípicas, funções e topografias diversas. As células endoteliais formam as paredes dos capilares; as células de Kupffer, que estão localizadas em estreita adjacência aos sinusóides, são macrófagos com papel importante de defesa; as células Pit têm um papel regulatório no crescimento e resposta imune dos hepatócitos; as células Ito, ou estocadoras de gordura, são

perisinusoidais e mais numerosas na zona periportal, onde ocorre o maior estoque de vitamina A.

Estas células promovem as diversas funções do fígado e são reguladas pela concentração de substrato no sangue, pelo nível de hormônio circulante, pelo sistema nervoso autônomo e pela matriz extracelular. As células parenquimatosas podem ser controladas ou controlar as células não parenquimatosas (JUNGERMANN & THURMAN, 1992). O fígado é o principal responsável pelo catabolismo das lipoproteínas contendo Apo B, que são secretadas pelo hepatócito como VLDL (Very Low Density Lipoprotein) nascente, bem como aquelas secretadas pelas células intestinais como quilomícrons.

2.2.3. Fisiologia do ponto de vista nutricional

No organismo, o fígado além de ser o centro de defesa, de exercer o controle no sistema hormonal e ser reservatório de sangue, é a sede dos processos bioquímicos relacionados com o metabolismo de nutrientes. O grau de saturação da gordura de depósito pode ser alterado por meios dietéticos uma vez que é dependente do tipo e quantidade de lipídios consumidos.

Para HARPER et al. (1982), os tecidos são capazes de introduzir uma dupla ligação no ácido graxo saturado correspondente, transformando o palmitato e o oleato em ácido palmitoléico e oléico. O fígado é o principal órgão na interconversão de ácidos graxos, uma vez que possui um sistema enzimático nos microsossomos, que catalisa a conversão da estearil-CoA e malonil-CoA na presença de oxigênio, de NADPH ou de NADH.

As duplas ligações adicionais dos ácidos graxos já mono-insaturados são introduzidas entre a dupla ligação já existente e o grupo carboxílico.

Portanto os animais são capazes de sintetizar a série de ácidos graxos insaturados (ω 9-ácido oléico) por uma combinação de alongamento da cadeia e dessaturação, porém são incapazes de sintetizar a série ω 6 contendo ácido linoléico e araquidônico ou a série ω 3, contendo ácido linolênico (GURR, 1986).

O consumo de ácidos graxos saturados contribui para o aumento da concentração do colesterol sérico (KRITCHEVSKY et al., 1983; GARG et al., 1989) enquanto que o consumo de ácidos graxos polinsaturados contribui para a sua diminuição (NORUN, 1992). Então a quantidade e o tipo de gordura, o colesterol livre (SÉROUGNE et al., 1995) ou o tipo de proteína (SJÖBLOM & EKLUND, 1990; ALJAWAD et al., 1992) ingeridos, produzem efeitos na concentração lipídica sangüínea.

No rato recém nascido ocorrem mudanças rápidas na composição corporal. Para entender a origem e significado destas mudanças é essencial o conhecimento da composição do leite materno e suas variações durante o curso da lactação. O leite de rata foi caracterizado por LUCKEY et al. em 1954 e mais recentemente por HARKNESS (1993) e por NEVES et al. (1995).

Vários fatores como temperatura ambiente (YAGIL et al. 1976), exercícios (TREADWAY & LEDERMAN, 1986), deficiência de sais minerais na ração das ratas (KEEN et al., 1981, BUCK & BALES, 1983) deprimem o crescimento dos filhotes por decréscimo na produção de leite ou por deficiência de nutrientes no leite materno.

Durante o desenvolvimento do rato ocorrem no fígado, mudanças drásticas na conversão de hidratos de carbono em lipídios (BALLARD & HANSON, 1967b; TAYLOR et al., 1967;), particularmente na hora do desmame quando o leite materno é substituído por dieta com alta

concentração de carboidrato e baixa de gordura, estimulando a lipogênese. Este fato ocorre devido a fatores hormonais e dietários que controlam a mudança de atividade das enzimas hepáticas envolvidas na conversão de hidratos de carbono em lipídios. LOCKWOOD et al. (1970) relataram que há aumento da acetil-CoA carboxilase ao desmame embora o seu padrão de desenvolvimento após o nascimento seja similar ao de outras enzimas hepáticas (TAYLOR et al. 1967).

2.3. Metabolismo lipídico

2.3.1. Considerações gerais

Os lipídios de importância metabólica para o organismo são os fosfolipídios, os triacilgliceróis, os esteróides e os produtos do metabolismo como ácidos graxos, glicerol e corpos cetônicos. Seguindo rotas metabólicas específicas, grande parte dos hidratos de carbono da dieta, segundo HARPER et al. (1982), pode ser transformado em lipídios antes de ser utilizado para fornecer energia ou fazer parte do organismo animal.

GURR (1986) nos diz que a importância dos lipídios no metabolismo reside no fato de contribuírem para a produção de energia celular. Para cumprir esta função eles precisam ser liberados do estoque de gordura e seguir seu caminho metabólico gerando energia química utilizável. Os ácidos graxos da dieta influenciam na composição lipídica de estoque dos monogástricos e são mobilizados dos tecidos quando a energia da dieta é limitada. A liberação da energia estocada é regulada pela quantidade e tipo dos diferentes componentes da dieta e por hormônios cuja secreção também pode ser regulada em parte pela dieta.

Normalmente pode-se encontrar maior ou menor quantidade de pequenos glóbulos de gordura em outros tecidos. Nos hepatócitos o acúmulo excessivo é uma condição patológica (CHURCH & POND, 1988), entretanto, algumas espécies de peixes normalmente armazenam a mesma proporção de gordura tanto no fígado como no tecido adiposo.

O estoque de lipídios pode ser derivado diretamente da gordura ingerida na dieta ou ser sintetizado no tecido adiposo, glândula mamária ou fígado e finalmente de açúcares simples originados dos hidratos de carbono da dieta. Quando existe pouca gordura na dieta, o padrão de ácidos graxos de estoque característico é inteiramente dependente da atividade de biossíntese. A introdução da gordura, suprime a atividade de síntese dos tecidos e opera o mecanismo de transporte dos ácidos graxos ingeridos para o estoque, de tal maneira que a composição torna-se agora mais relacionada com a dieta (PARRISH et al., 1991).

Lipídios estruturais principalmente os fosfolipídios, glicolipídios e colesterol participam da composição das membranas biológicas que atuam como barreiras entre os compartimentos do corpo onde ocorre a produção de várias substâncias bioquímicas do metabolismo (GURR, 1986).

Gordura de estoque são principalmente os triacilgliceróis, fonte de energia para o organismo quando há pouco consumo de alimento. Os TAG são estocados nos adipócitos e o acúmulo de lipídios e sua liberação do tecido adiposo são controlados pela interação entre fatores dietários e hormonais. As moléculas de gordura nas membranas e nos depósitos ocorrem em grandes agregados. Moléculas individualizadas de gordura podem ser liberadas de cada uma das fontes por processos que utilizam enzimas específicas e convertidas em metabólitos com funções importantes. Ainda que as gorduras sejam insolúveis em água, elas precisam ser transportadas para

os tecidos do corpo na corrente sanguínea, o que é feito pela sua ligação às proteínas na forma de lipoproteínas (HARPER, et al. 1982).

A taxa de lipólise pode ser alterada pela disponibilidade de nutrientes e, em menor extensão, pela composição da dieta especialmente as formuladas com grande quantidade de ácidos graxos saturados. A quantidade de lipídios nos adipócitos é determinada tanto pela taxa de lipólise quanto pela síntese. Estes processos ocorrem simultânea e continuamente determinando o conteúdo de lipídios de depósito (VERNON, 1992).

A composição e a quantidade de dieta podem potencialmente influenciar na lipólise pela alteração dos seguintes parâmetros: concentração sérica de hormônios; atividade do sistema de inervação simpático; composição da membrana celular e capacidade do adipócito de transmitir sinais. A insulina sérica varia diretamente com o teor de hidrato de carbono na dieta enquanto o glucagon sérico tende a decrescer quando o conteúdo de carboidrato aumenta (UNGER & ORCI, 1976). A atividade simpática é mais influenciada pela quantidade de proteína da dieta do que pela gordura ou hidrato de carbono (VAN DER TUIG & ROMSOS, 1984).

A dieta também pode alterar a capacidade da célula adiposa de transmitir sinais. Ratos alimentados com dietas contendo alta concentração de gordura saturada respondem fracamente à ação lipolítica das catecolaminas quando comparados a animais alimentados com dietas ricas em hidratos de carbono (GORMAN et al., 1972; SMITH et al., 1974; SUSIMI et al., 1979; TEPPERMAN et al., 1986). Estudo com tecido adiposo humano não revelou diferença na resposta ou sensibilidade para catecolaminas após a ingestão de dietas ricas em hidratos de carbono por 7 dias (KATHER et al., 1987). Em outra pesquisa, VERNON (1992) concluíram que a dieta rica em gordura faz decrescer a ação lipolítica da insulina.

Outros pesquisadores sugerem que a natureza dos ácidos graxos é mais importante do que a quantidade de gordura ingerida. Dietas ricas em gordura polinsaturada tem resposta lipolítica maior para catecolaminas do que dietas ricas em gordura saturada (CARREAU et al., 1972; AWAD & CHATTOPADHYAY, 1986; PARRISH et al., 1991). Mudanças na fluidez da membrana também podem alterar a resposta à insulina que estiver ligada, a ação sobre os adipócitos (CLANDININ et al., 1991) e agir sobre o número de β -receptores em outros tecidos.

O papel do fígado na síntese e secreção de lipoproteínas é de grande importância e regulado por receptores de lipoproteínas (HAVEEL, 1988). Na maioria dos mamíferos, inclusive humanos, é o único local de síntese da apolipoproteína B-100 (Apo-B-100) que é necessária para a formação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e outras partículas.

Para MEZEY (1978), o fígado é a principal fonte de colesterol, secreta praticamente toda a VLDL que é convertida lipoliticamente em lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e de baixa densidade (LDL). É também o local de maior catabolismo de todas as proteínas que contém a Apo-B.

Segundo SPADY et al. (1985), 60 a 80% da LDL é retirada do plasma por receptores dependentes e a restante é removida por receptores independentes. Estes receptores estão distribuídos sem uniformidade nos diferentes órgãos e são regulados de maneiras distintas. A taxa de remoção da LDL, pelo receptor dependente, aumenta conforme aumenta a concentração de LDL plasmático até 400 mg/dL, quando satura o sistema. O receptor independente tem uma função linear à concentração de LDL, sendo constante a retirada da LDL do plasma através deste processo (SPADY et al., 1986).

2.3.2. Metabolismo hepático das lipoproteínas

As lipoproteínas são formadas principalmente por apoproteínas, fosfolipídios, triacilgliceróis (TAG), colesterol e pouca quantidade de hidrato de carbono. Os TAG de origem alimentar são transportados pelos quilomícrons, as VLDL são sintetizadas pelo fígado e secretadas nos espaços de Disse. Os TAG são removidos das lipoproteínas pela ação de lipases transformando a VLDL em IDL e posteriormente em LDL. Estas constituem uma forma de retirar o colesterol do fígado uma vez que são captadas por receptores específicos das células. Os hepatócitos secretam a HDL nascente como partículas discoidais contendo colesterol livre que é esterificado pela ação da enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LACT), ativada pela Apo-AI que é sintetizada pelo fígado (HARPER et al., 1982).

No homem e em algumas espécies animais a LDL é a lipoproteína que mais transporta colesterol no plasma e é regulada pela taxa de síntese de LDL e pela eficiência do catabolismo hepático via caminho da alta afinidade com o mecanismo receptor independente (BHATTACHARYA, et al., 1984). Em várias espécies, inclusive no rato, foi demonstrado que mais de um terço da LDL plasmática é degradada no fígado (STEIN et al., 1981; PITTMAN et al., 1979). Estas e outras observações aumentam as probabilidades de que as mudanças na capacidade do fígado de captar e degradar LDL podem ser reguladas pela concentração plasmática de LDL.

KUIPERS et al. (1989) investigando a secreção biliar de colesterol e sais biliares derivados do oleato colesteril LDL, em ratos Wistar, concluíram que os sais biliares são apenas uma pequena fração dos esteróides. O que pode ser explicado inicialmente pela captura destas lipoproteínas pelas células sinusoidais, seguida de sua degradação e reentrada do colesterol no sangue e uma segunda eventual saída do colesterol do "pool" disponível para

síntese de ácidos biliares nos hepatócitos. A captura da LDL modificada pelas células sinusóides hepáticas pode produzir um mecanismo protetor para o corpo convertendo o colesterol aterogênico em uma espécie menos danosa que é a lipoproteína de alta densidade (HDL). Este mecanismo pode ser importante em situações de baixa atividade dos receptores de LDL nos hepatócitos. Mudanças na taxa de síntese, catabolismo exagerado ou decréscimo na remoção de LDL podem alterar a sua concentração plasmática.

Apesar da similaridade com outras espécies a concentração plasmática de LDL do rato é relativamente baixa devido à diferença na regulação de seu metabolismo. Diferente de outras espécies, o rato é o único animal que não desenvolve aterosclerose em certas condições experimentais (SUCKLING & JACKSON, 1993).

Os resultados de BHATTACHARYA et al. (1986) indicaram que no rato os hormônios da tireóide influenciam o metabolismo da LDL, não ocorrendo o mesmo fenômeno no consumo de colesterol via direta ou em manipulações que aceleraram a conversão de colesterol em sais biliares. Em 1995, FORSYTHE, estudando a influência da proteína de soja na regulação da tireóide e no metabolismo do colesterol concluiu que a fonte protéica da dieta afeta a concentração plasmática do T4 e que a proteína de soja é hipocolesterolêmica porque provoca aumento na concentração de T4 no plasma.

2.3.3. Alterações metabólicas

Os ácidos graxos, liberados por lipólise do tecido adiposo, que circulam ligados à albumina, são removidos pelo fígado e pelo tecido muscular na proporção de um para dois. Os TAG, após serem captados pelo fígado, podem ser oxidados ou utilizados para formação de corpos cetônicos, na

ressíntese de TAG ou na síntese de fosfolipídios. A maior parte dos TAG sintetizada pelo fígado é secretada sob forma de VLDL.

A captação hepática de ácidos graxos, tanto os derivados da alimentação quanto os resultantes do tecido adiposo é seguida de esterificação. Este processo está intimamente associado à fosforilação oxidativa e depende da quantidade de glicerol-fosfato e de Acetil-CoA disponível (GURR, 1986).

O ser humano não é capaz de sintetizar ácidos graxos com ligações dupla que estejam distantes mais do que 9 carbonos do grupamento carboxila da cadeia (LEAF & WEBER, 1988). Esta é a razão pela qual 1,3 % do total das calorias da dieta devem ser proveniente do ácido linoléico (PUDELKEVICZ et al., 1986). No entanto, para outros autores como LOTTENBERG (1992) estas calorias devem atingir de 2 a 3% .Toda esta atividade é realizada quando o organismo está saudável e o aporte nutricional é suficiente. Quando há falha por uma disfunção qualquer, ocorrem alterações bioquímicas e morfológicas que podem ser observadas ao microscópio óptico e eletrônico.

Estas alterações podem ser da parede sinusoidal, dos canaliculos biliares, do hepatócito ou processos degenerativos como atrofia ou esteatose. As células hepáticas estão expostas a frequentes alterações bioquímicas ou morfológicas, pois recebem em primeira mão, substâncias da absorção intestinal (BARROS COELHO, 1971). As alterações metabólicas dos lipídios, proteínas e glicogênio, resultante de um excesso ou de alterações físico-químicas, promovem lesões degenerativas ou infiltrativas das células hepáticas que podem ser identificadas por métodos histoquímicos e morfológicos.

No caso de atrofia, as células hepáticas diminuem de tamanho, são pobres em glicogênio, o citoplasma é denso, contendo pigmento férrico e os chamados pigmentos de desgaste. Na tumefação turva as lesões mais evidentes são edema e vacuolização das mitocôndrias com as células aumentadas de volume, citoplasma finamente granular, contornos poucos nítidos e os sinusóides mais estreitos. Neste caso o fígado se apresenta aumentado de volume, flácido, de coloração escura, não se distinguindo o delineamento celular. (BARROS COELHO, 1971).

2.3.4. Esteatose hepática

A esteatose se caracteriza pela presença de grandes gotas de gordura dentro da célula hepática e quando é acentuada, o fígado na maioria das vezes está aumentado de tamanho, é castanho pálido ou amarelo, de bordos arredondados e cápsula tensa.

Várias perturbações orgânicas induzidas por inúmeros agentes e por mecanismos diversos podem produzir acúmulo de gordura no hepatócito. Para LOMBARDI (1966) e LOMBARDI et al. (1968), esteatose hepática é resultado do desequilíbrio entre a síntese e a utilização de triacilgliceróis hepáticos e pode ter origem nos seguintes mecanismos: síntese normal de TAG e bloqueio na sua utilização e transporte; síntese aumentada de TAG e utilização normal ou síntese aumentada e bloqueio na utilização de TAG.

Os triacilgliceróis que contribuem para a esteatose hepática podem resultar de um ou da combinação de três fatores: dieta, ácidos graxos liberados do tecido adiposo ou aumento da síntese de ácidos graxos no fígado. GOHEEN et al. (1980) mostraram que os triacilgliceróis do fígado eram originados da dieta e que o decréscimo da lipogênese não teria papel importante na redução da gordura do fígado.

Entretanto para HAVEL et al. (1970), a mais importante fonte de ácidos graxos para a formação dos TAG hepáticos é a lipólise do tecido adiposo periférico. Sua redução e conseqüente decréscimo do nível plasmático de ácidos graxos livres, bem como o baixo influxo destes para o fígado são os pré-requisitos para a diminuição da síntese de triacilgliceróis hepáticos.

O excesso de um aminoácido na dieta pode também contribuir para o acúmulo de lipídios no fígado, pelo aumento do "pool" de esqueletos de carbonos disponíveis para oxidação ou síntese de ácidos graxos. HEVIA & VISEK (1980) concluíram que o fígado gorduroso por excesso de lisina era resultado de uma obstrução no transporte dos lipídios do fígado para a circulação. Os dados mostraram que o excesso causava não só acúmulo de lipídios no fígado mas também mudanças nas lipoproteínas circulantes, particularmente na elevação de LDL e que isto podia ser prevenido ou abolido pela manipulação da dieta.

O excesso de cistina na alimentação de ratos, onde foi utilizado o isolado de soja como fonte protéica provocou esteatose hepática mas não houve repetição deste fenômeno quando a proteína da dieta foi a caseína. O acréscimo de metionina ou colina, na dieta que continha isolado de soja com excesso de cistina, preveniu o acúmulo de triacilgliceróis e fosfolipídios no fígado, apesar dos TAG séricos não terem retornado aos níveis dos encontrados nos ratos alimentados com dieta sem cistina e de não terem sido alterados os níveis séricos de ácidos graxos. Portanto, AOYAMA et al. (1992a) concluíram que fígado gorduroso pode resultar da deficiência de colina induzida pelo excesso de cistina. Este fato já tinha sido observado por LOMBARDI et al. (1968) que, trabalhando com dietas deficientes em colina, obtiveram esteatose hepática em ratos como resultado da deficiente liberação dos TAG hepáticos para o plasma.

Segundo MILNER & PERKINS (1978) a deficiência de arginina em ratos causou alteração no metabolismo lipídico similar a observada quando o ácido orótico foi colocado na dieta. A deficiência de arginina estava associada ao aumento de concentração de ácido orótico na urina e no sangue. Nos ratos mantidos com dietas deficientes em arginina por 35 dias, ocorreu acúmulo ao redor de 20% de lipídios no fígado sem sinais de necrose. Apesar da deficiência de arginina causar esteatose via mecanismos diversos, os autores concluíram que o aumento da produção de ácido orótico causado pela deficiência de arginina era o responsável pelo acúmulo de lipídios no fígado. Já LOMBARDI et al. (1968) haviam observado que a esteatose hepática encontrada em ratos alimentados com deficiência de colina foi resultado da queda na liberação dos TAG para o plasma.

A nutrição parenteral total (TPN), aceita como método viável de alimentação para pacientes impossibilitados de se alimentarem via oral, pode ocasionar diversos problemas relacionados ao metabolismo de lipídios. Segundo KEIM & MARES-PERLMAN (1984), vários fatores contribuem para o acúmulo de lipídios no fígado, incluindo o aumento do afluxo, síntese, decréscimo de oxidação ou aumento na esterificação de ácidos graxos e diminuição da síntese de apolipoproteínas, assim como impedimento na sua formação ou secreção. Os autores concluíram que tanto o aumento de lipogênese como a deficiência no transporte de ácidos graxos do fígado foram os maiores responsáveis pela esteatose de ratos submetidos a nutrição parenteral total.

SAX et al., (1986) concluíram que a esteatose hepática observada na TPN foi resultado de um excesso de administração de glicose e que a esteatose obtida não era dependente das mudanças ocorridas nas concentrações sanguíneas do nível das enzimas hepáticas. Entretanto, em

1980 KAMINSKI et al. já haviam concluído que TPN com glicose, em nível calórico adequado ou excessivo, conduzia a um aumento significativo da atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase. Já QUIGLEY et al. (1993) mostraram que o uso da TPN provoca esteatose como consequência do excesso de calorias ou do desequilíbrio carboidrato/lipídio. Assim, em situações onde ocorre disfunção hepática a TPN pode contribuir tanto para aumentar como para iniciar o processo. Ainda a desnutrição, um pré-requisito para o uso da TPN, também pode causar esteatose hepática, sendo a mesma exacerbada pelo processo de alimentação via venosa.

Pesquisa feita por CHANG & SILVIS (1974) demonstraram que a infusão de calorias em taxa maior do que 300 kcal/kg/dia induziu esteatose hepática em ratos. KEIM & MARES-ERLMAN (1984) estudando ratos com acúmulo de lipídios em TPN livre de gordura, mas com excessiva energia proveniente de dextrose e de aminoácidos, num total de 350 kcal/kg/dia, observaram o desenvolvimento de esteatose por deficiência de ácidos graxos essenciais.

Para BOUZIANE et al. (1992) os principais sinais de deficiência de ácidos graxos essenciais são esteatose hepática e aumento na proporção do ácido eicosatrienóico (20:3 n-9) / eicosatetraenóico (20:4 n-6), em vários tecidos. Também em 1984, SANO & PRIVETT trabalhando com deficiência de ácidos graxos essenciais, concluíram que o acúmulo de gordura no fígado de ratos foi causado pela redução da liberação dos lipídios para o sangue, indicando um defeito na síntese de lipoproteínas.

No entanto, para DOHERTY et al. (1991) a esteatose que ocorre nos desnutridos é devida à ausência de peroxisomas nos hepatócitos. Peroxisomas são organelas menores e menos numerosos que as mitocôndrias, distribuídas nas células dos mamíferos especialmente nos

hepatócitos. São arredondados, com membrana única, densidade eletrônica moderada e , em circunstâncias normais, efetuam ao redor de 10% da β - oxidação dos lipídios.

O estresse é caracterizado por várias alterações bioquímicas e hemodinâmicas como o aumento da pressão sanguínea, das catecolaminas plasmáticas, dos ácidos graxos livres, das tromboxanas e do depósito de gordura no fígado. SINGER & RICHTER-HEINRICH (1991), associaram a esteatose com o decréscimo do ácido eicosapentaenóico (EPA) nos triacilgliceróis hepáticos e indicaram a suplementação da dieta com peixe ou óleo de peixe marinho, como tratamento preventivo e terapêutico, para proteger o organismo contra o estresse e conseqüente esteatose.

KAMINSKI et al. (1980) associaram hiperalimentação com esteatose morfológicamente comprovada, através de exames laboratoriais. Os dados indicaram aumento no depósito de lípidos no fígado, tanto no homem como em ratos, e que a administração de um agente lipogênico pode prevenir o processo em ratos. Os autores concluíram que o acúmulo patológico de grandes quantidades de lipídios hepáticos em animais recebendo hiperalimentação indica que a maior parte das calorias ingeridas não foi utilizada.

A incidência de esteatose humana é muito alta, independente dos fatores abuso de álcool, diabetes mellitus, obesidade, estados de debilitação física, por exemplo, e prenuncia uma sensibilidade de deterioração hepática (HUI et al., 1995). Por outro lado, dada a ênfase que os transplantes hepáticos merecem no momento, o fígado de rato, pela semelhança estrutural com o fígado humano, (TANIKAWA, 1968) está sendo, desde a década de 70, estudado em situações de hepatectomia. É interessante notar que mesmo no processo regenerativo por injúria mecânica ou implante de ilhotas

pancreáticas, a resposta inicial do fígado é a formação de uma área de esteatose (DE PAEPE et al., 1995) cuja evolução para a normalidade dependerá do estado inicial do órgão.

2.4. Efeitos do uso de triacilgliceróis de cadeia média e de cadeia longa na dieta

A síntese de lipídios é regulada pelas necessidades do corpo e pela dieta, estando relacionada com a quantidade de lipídios ingeridos. Quando a concentração de gordura na dieta é baixa, a taxa de síntese de ácidos graxos é alta visando suprir as necessidades de gordura estrutural e de estoque do corpo. Quando o consumo de energia e os hidratos de carbono da dieta são altos, a taxa de síntese de ácidos graxos do fígado também é alta, assegurando um elevado suprimento de VLDL, de esterificação e de grande estoque no tecido adiposo.

Os triacilgliceróis provenientes da dieta diferem um do outro pelo comprimento de cadeia, distribuição na molécula de glicerol, no número e posição das duplas ligações e na geometria. Os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são conhecidos por terem mais vantagens fisiológicas sobre os triacilgliceróis de cadeia longa (TCL). Os TCM são mais solúveis em água, independem de sais biliares e da lipase pancreática pois não requerem formação de micelas para digestão e absorção, são transportados diretamente para o fígado, via porta, como ácidos graxos não esterificados e rapidamente oxidados (BACH & BABAYAN, 1982; BABAYAN, 1987). Além disso não dependem da carnitina para entrar nas mitocôndrias, representando uma alta fonte de combustível disponível para ser oxidado pelos tecidos (MASCIOLI et al., 1987).

Diferenças nas estruturas de ácidos graxos induzem a significativas mudanças nas concentrações de lipídios e lipoproteínas plasmáticas. Estudando vários tipos de ácidos graxos KATAN et al. (1994) concluíram que pouca quantidade de gordura na dieta não só causa queda na concentração de LDL como também de HDL. No início do tratamento este efeito pode ser compensado pela mobilização da gordura de depósito mas depois é estabilizado.

GALLUSER et al. (1993) comparando lipídios, como substrato na adaptação intestinal de ratos, concluíram que o uso de TCM aumentou a massa da mucosa intestinal, não afetou a composição dos lipídios da bordadura em escova, nem a atividade de hidrolases, portanto confirmam as vantagens de sua utilização para renovar a massa da mucosa do intestino e disponibilidade rápida de energia para consumo.

A manipulação da dieta, especialmente na modificação do conteúdo de gordura, pode alterar a composição dos lipídios dos tecidos, das células e do soro. MLEKUSCH et al. (1993) comparando dietas para ratos, conteúdo alta e baixa concentração de ácidos graxos saturados e insaturados, concluíram que o nível de gordura da dieta influencia de maneira semelhante os fosfolipídios e ácidos graxos do fígado, na mesma proporção da quantidade deles na dieta. Observaram ainda que o nível de ácidos graxos das duas dietas com alta taxa de gordura foi mais similar entre si do que com o grupo controle.

Por uma série de reações enzimáticas de dessaturação e alongação, os ácidos graxos poliinsaturados, como o araquidônico (20:4 n-6) e o docosahexaenóico (22:6 n-3), podem ser sintetizados dos ácidos graxos essenciais da dieta, linoléico (18:2 n-6) e linolênico (18:3 n-3) respectivamente (SALVAY, 1994). A partir disso WALL et al. (1994) trabalhando com 3% de óleo de peixe, como fonte de ácidos graxos de cadeia longa, em dieta com

TCM, encontraram um decréscimo nos TAG do fígado, dos rins e uma redução na percentagem de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa no plasma, fígado e rins. Estes resultados mostraram que a interação dos ácidos graxos de cadeia longa, provenientes do óleo de peixe, com os saturados da dieta dever ser cuidadosamente considerada antes de seu uso nas formulações infantis.

Em animais com deficiência protéica crônica, a falta de proteína pode aumentar o requerimento de ácidos graxos essenciais e precipitar uma deficiência marginal. BOUZIANE et al. (1992), trabalhando com ratos em deficiência protéica com concentrações baixas e adequadas de ácido linoléico, encontraram relação entre o metabolismo lipídico e o consumo de proteína na dieta através de evidências de que alguns efeitos da desnutrição protéica foram exacerbados pela deficiência de ácidos graxos essenciais.

Estudos realizados comparando metabolismo de triacilgliceróis compostos por TCM e TCL mostraram o efeito destes na alimentação, evidenciando que dietas com triacilgliceróis de cadeia média induzem a um menor depósito de gordura corporal (LAVAU & HASHIM, 1978). Entretanto este estudo não previu o consumo igual de calorías. Em 1983, GELIEBTER et al. realizaram um experimento com TCM onde controlaram, por alimentação intragástrica, o consumo preciso de energia. Concluíram que o decréscimo na deposição de gordura, em ratos, foi resultado da rápida oxidação hepática dos TCM após serem transportados pela veia porta, liberando pouco deles para incorporação na gordura corporal. BACH & BABAYAN (1987) já haviam relatado que a maioria dos ácidos graxos de cadeia média eram retidos pelo fígado e só pequena quantidade aparecia na circulação sanguínea e por pouco tempo.

Dietas ricas em carboidratos aumentam a síntese de novo de ácidos graxos e colesterol pelo fígado. Segundo LAVAU & HASHIM (1978) esta síntese diminuiu quando um pouco de hidrato de carbono foi substituído por gordura. O decréscimo foi menor quando TCM foi fornecido na dieta em lugar do TCL. Assim como no fígado os ácidos graxos de cadeia média inibem discretamente a síntese de novo de ácidos graxos no tecido adiposo.

O uso de TCM na alimentação induz a cetose em várias espécies. YEH & ZEE (1976) já haviam estudado a produção de corpos cetônicos induzidos pelo uso de TCM, baseados na rápida oxidação de ácidos graxos de cadeia média. Os resultados destes autores mostraram claramente que a taxa de oxidação dos TCM é de 4 a 6 vezes maior do que a dos TCL. Hiperinsulinemia, hipoglicemia e depressão de lipogênese resultantes da ingestão de dietas com TCM, parecem potencializar mas não iniciar a cetose.

Para suas necessidades físicas e processos metabólicos, os animais necessitam de energia. Esta é fornecida principalmente pela ingestão de hidratos de carbono, gorduras e pelas proteínas que não foram utilizadas para síntese. A energia bruta pode ser calculada a partir da determinação da composição centesimal da dieta ou representar o valor médio da combustão completa em uma bomba calorimétrica adiabática.

Analisando a proporção dos ácidos graxos dos TAG podemos calcular a energia máxima fornecida pela dieta. A energia bruta dos ácidos graxos saturados aumenta com o comprimento da cadeia e diminui de acordo com o número de ligações duplas (MORAN, 1994). LING et al. (1986) já haviam atribuído valores diferentes de 9,1 e 8,6 kcal/g para TCL e TCM respectivamente. Os ácidos graxos de cadeia longa são importantes como forma de energia e podem ser utilizados pelas células ou estocados no tecido adiposo. Os TCL são transportados como quilomícrons pelos vasos linfáticos

e se mostram dependentes da carnitina para atravessar as membranas mitocondriais para a β -oxidação (LING et al., 1986).

SCHRIJVER & PRIVETT (1982), estudando o efeito dos ácidos graxos de cadeia longa na biossíntese de ácidos graxos insaturados em ratos, encontraram dados indicativos de que utilizando o ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3) e docosahexaenóico (22:6 n-3) diminuiu o requerimento de ácido linoléico na dieta. A interação destes interfere no tipo e quantidade de ácidos graxos de cadeia longa depositados no tecido animal e na regulação da biossíntese de ácidos graxos polinsaturados. BANERJEE et al. (1992), trabalhando com diferentes ácidos graxos polinsaturados na dieta, provenientes de óleo de peixes marinhos, concluíram que o efeito hipolipidêmico dependeu da composição dos ácidos graxos polinsaturados (n-3) ingeridos.

3 .MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e delineamento experimental

O ensaio biológico foi realizado no Biotério do Departamento de Nutrição e Planejamento Alimentar da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em duas etapas conforme descrito a seguir:

3.1.1. Primeira etapa

Dietas isoprotéicas, contendo sete modelos de aporte lipídico, foram formuladas no laboratório para 90 ratos albinos machos SPF, da linhagem Wistar, recém desmamados, com 21 dias de idade e peso ao redor de 50 gramas, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB-UNICAMP).

Após serem adaptados por 3 dias em dieta padrão, os animais estavam pesando ao redor de 57 gramas. Foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 18 e dois grupos de 9 ratos cada, colocados em gaiolas individuais, todos com livre acesso à água e à respectiva dieta, em temperatura ambiente de 24°C, controle cíclico de 12 horas luz/escuridão.

A designação CAS indica caseína como fonte protéica e o sufixo IN ou SA indicam o tipo de ácido graxo insaturado e saturado respectivamente. Os dígitos colocados após os códigos das dietas indicam a percentagem de

gordura utilizada nos primeiros e últimos 15 dias do experimento respectivamente.

O grupo CASIN-7/7 (padrão), recebeu a dieta AIN-93. O grupo CASIN-30/30 recebeu dieta AIN-93 com 30% de óleo de soja. Para dois outros grupos, de 18 animais cada, formulou-se a AIN-93 com gordura de coco nas proporções de 7% para o grupo CASSA-7/7 e de 30% para o grupo CASSA-30/30. A fonte protéica de todas as dietas foi caseína. O quinto grupo de animais recebeu dieta sem proteína (APROT) cuja fonte lipídica foi 7% de óleo de soja. Um grupo de ratos recém desmamados (RD), com 9 ratos, foi sacrificado no início do experimento para análise de sangue e de fígado, configurando o estado metabólico inicial.

No 15o dia, após pesagem, foram sacrificados 9 animais de cada um dos 4 grupos para análises bioquímicas do sangue, do fígado e análise histológica. O grupo APROT foi eliminado quando cumpriu o objetivo de fornecer dados para cálculo da Razão da Eficiência Protéica Líquida (NPR), Digestibilidade (D) e Valor Biológico (VB). Ainda no décimo quinto dia, os 9 ratos restantes dos grupos que estavam recebendo 30% de lipídios na dieta passaram a receber, até o final do experimento (mais 15 dias), suas dietas correspondentes, porém com redução de 25% do respectivo lipídio e foram chamadas de CASSIN-30/5 e CASSA-30/5. As dietas que sofreram redução lipídica de 30% para 5% visavam a recuperação metabólica dos animais. Os grupos de ratos com 7% de aporte lipídico inicial continuaram com a mesma dieta.

O esquema do experimento acima encontra-se na Figura 4.

3.1.2. Segunda Etapa

Após coleta dos dados e verificação dos resultados da etapa acima descrita, foi realizada a segunda e última fase experimental.

Vinte e sete ratos com as mesmas características e mantidos nas mesmas condições experimentais anteriores foram usados na segunda etapa. Após adaptação por um período de 3 dias os animais foram divididos em grupos de 9 ratos, permanecendo nas respectivas dietas por 30 dias:

O grupo CASIN- 7/7 - recebeu dieta AIN-93

O grupo CASIN-30/30 - recebeu dieta AIN-93, onde o lipídio foi aumentado de 7% para 30% (óleo de soja).

O grupo CASSA-30/30 - recebeu dieta AIN-93, onde o lipídio foi substituído e aumentado para 30% de gordura de coco.

No final do experimento, os animais foram sacrificados de acordo com o protocolo anterior.

O esquema experimental da segunda etapa encontra-se na Figura 5.

3.2. Composição das dietas experimentais

As dietas (Tabela 3) foram preparadas, segundo REEVES et al. (1993) do American Institute of Nutrition (AIN), alterando o tipo e/ou a quantidade de gordura. As variações no teor de lipídios foram feitas em detrimento da fração glicídica. O total de alimento necessário foi calculado e preparado previamente para cada ensaio, conservado em sacos plásticos, sob congelamento (-14°C) até o dia anterior ao consumo quando passavam para refrigeração (5°C) e no dia do início do consumo para temperatura ambiente.

O alimento foi oferecido em forma de pó. Os ingredientes das rações foram misturados manualmente em recipiente de plástico. A mistura formada foi peneirada três vezes e os lipídios foram adicionados lenta e cuidadosamente por último. A ração obtida foi peneirada mais três vezes com a finalidade de obtenção de um produto bem homogeneizado.

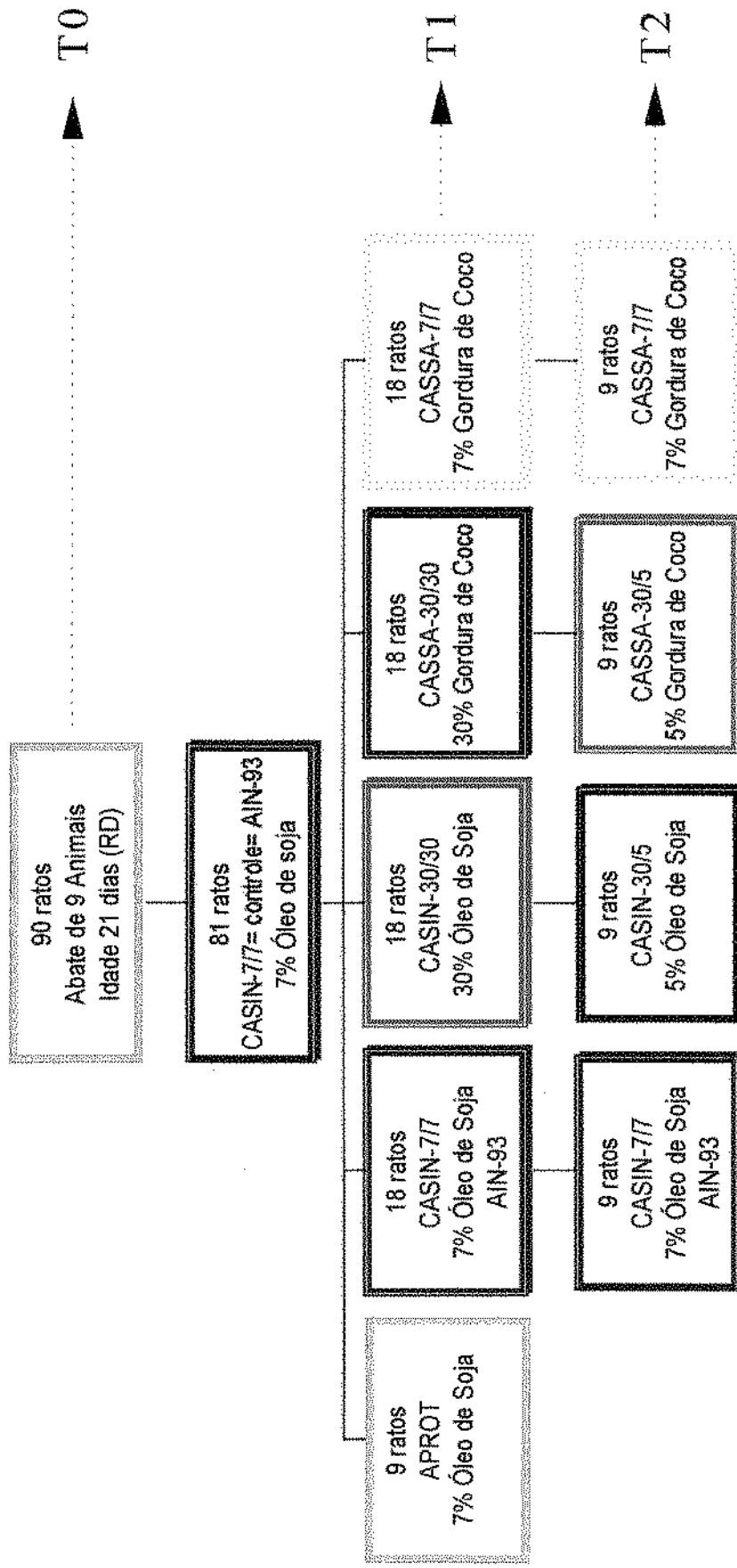


Figura 4. Desenho do esquema experimental da primeira etapa dos ensaios biológicos.

T0 = Início do experimento

T1 = Amostras coletadas ao 15º dia de experimento

T2 = Amostras coletadas ao 30º dia de experimento

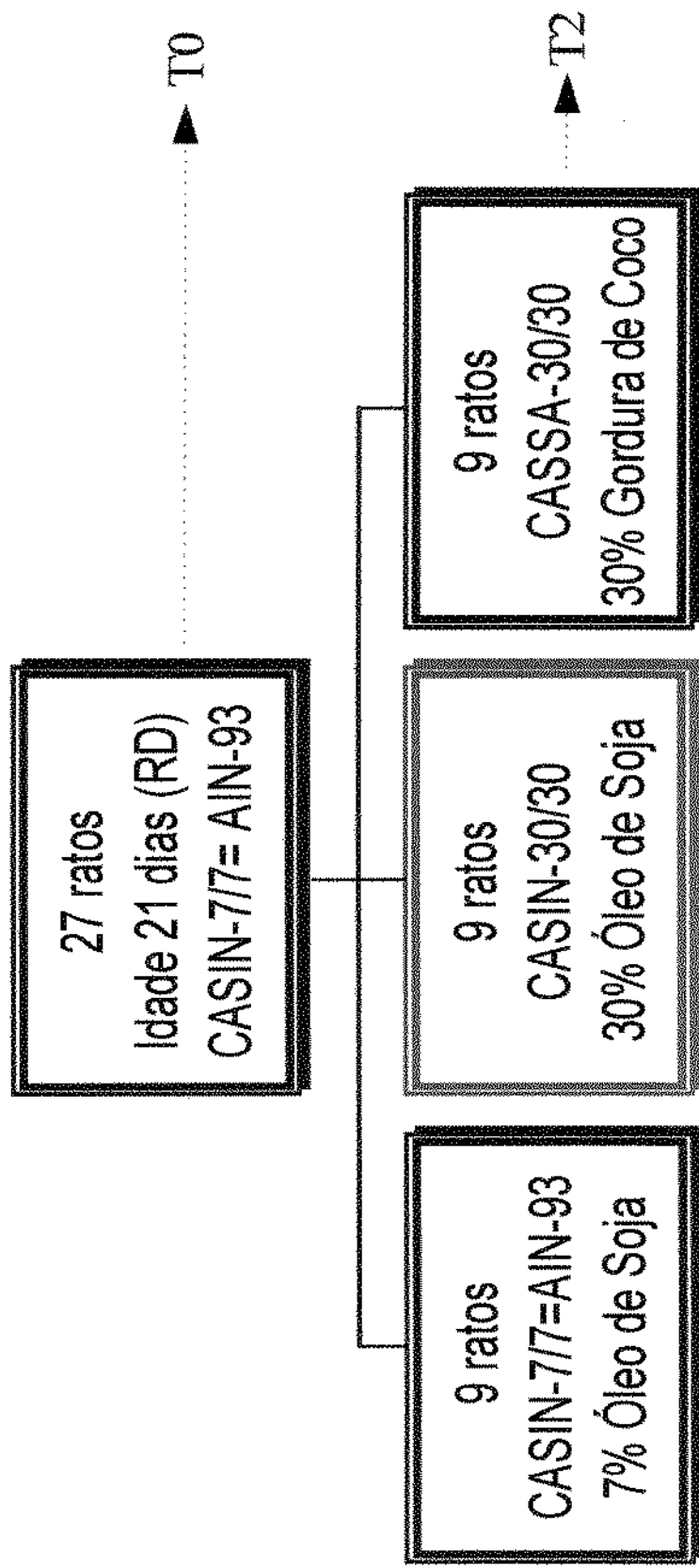


Figura 5. Desenho do esquema experimental da segunda etapa dos ensaios biológicos.

T0 = Início do experimento

T2 = Amostras coletadas ao 30° dia de experimento

Tabela 3 - AIN-93G- Dieta formulada para a fase de crescimento, gestação e lactação de roedores conforme REEVES et al., (1993)

INGREDIENTES	g/kg de dieta
Amido de milho	397,486
Caseína ($\geq 85\%$ de proteína)	200,000
Amido dextrinizado	132,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	70,000
Fibra (Celulose)	50,000
Mistura Mineral (AIN-93G-MX) (Tab. 5)	35,000
Mistura Vitamínica (AIN-93-VX) (Tab. 6)	10,000
L-Cistina	3,000
Bitartarato de Colina - 41,1% de colina	2,500
Terbutildroquinona	0,014
Dieta q.s.p.	1000,000

A caseína comercial utilizada continha 82,88% de proteína bruta. A fração carboidrato da dieta foi fornecida por amido de milho comercial, o óleo de soja e a gordura de coco foram comerciais e tiveram o perfil de ácidos graxos determinados por cromatografia gasosa (HARTMAN & LAGO, 1973 - Tabela 4). Todos os componentes das rações foram selecionados de acordo com os padrões da AIN-93 (REEVES et al., 1993).

Tabela 4 - Quantidade de ácidos graxos determinados, em percentagem, por cromatografia gasosa, nas gorduras utilizadas para formulação das dietas

ÁCIDOS GRAXOS		ÓLEO DE SOJA	GORDURA DE COCO
C8:0	Caprílico	-	4,18
C10:0	Capróico	0,08	3,76
C12:0	Láurico	0,01	48,54
C14:0	Mirístico	0,07	14,90
C16:0	Palmitico	10,73	8,03
C18:0	Esteárico	3,19	2,08
C18:1	Oléico	26,59	15,22
C18:2	Linoléico	52,77	3,11
C18:3	Linolênico	4,88	0,06
C20:0	Araquídico	0,12	0,08
Outros		1,56	0,04
Total de A G Ins		84,24	18,39
Total de A G Sat		14,20	81,57
Rel. AG Ins. X Sat.		5,93	0,22

A formulação das misturas mineral e vitamínica (preparada e cedida pela Roche) encontram-se nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 5 - Mistura mineral AIN-93G-MX (REEVES et al., 1993) que supre as concentrações de elementos da dieta AIN-93G

INGREDIENTES	g/kg
<i>Elementos minerais essenciais:</i>	
Carbonato de cálcio anidro - 40,04 %	357,00
Fosfato de potássio monobásico - 22,76% P; 28,73%K	196,00
Citrato de potássio, tri-K, monoidratado - 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio - 39,34% Na ; 60,66% Cl	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio - 60,32%	24,00
Citrato férrico - 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco - 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês - 47,79% Mn	0,63
Carbonato de cobre - 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio - 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro	0,01025
Paramolibidato de amônio, 4H ₂ O - 54,34% Mo	0,00795
<i>Elementos minerais potencialmente benéficos:</i>	
Meta-silicato de sódio, 9H ₂ O - 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico, 12 H ₂ O - 10,42% Cr	0,275
Cloridrato de lítio - 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico - 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio - 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel - 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio - 43,55% V	0,0066
Sacarose (q.s.p.)	221,026

Tabela 6. Mistura vitamínica AIN-93-VX (REEVES et al., 1993) que supre as necessidades das concentrações de vitaminas da dieta AIN-93G

VITAMINAS	g/kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina-HCL	0,700
Tiamina-HCL	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all- <i>cis</i> - α - tocoferol (E) (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all- <i>trans</i> - retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D3) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (Vitamina K)	0,075
Sacarose (q.s.p.)	974,655

3.3. Controle do peso corporal e do consumo de dieta

Após o período de adaptação e divisão dos animais em grupos, mediu-se a cada 3 dias, o consumo de ração. A quantidade de dieta ingerida foi determinada pela diferença de peso entre a oferta, as sobras e as perdas. A ingestão calórica foi feita por determinação da energia bruta da dieta em Bomba Calorimétrica Adiabática PARR 1261 e calculada sobre o consumo de cada animal.

As pesagens foram feitas no mesmo dia da medida do consumo alimentar, sempre iniciando o trabalho às 7:00 horas.

A água era trocada e os bebedouros lavados durante o controle do consumo alimentar e pesagem dos animais.

3.4 - Sacrifício dos animais e coleta de amostras

O início foi considerado tempo zero (T0), o 15o dia, tempo um, (T1) e o 30o dia, tempo dois (T2) do experimento. Após 16 horas de jejum, nos tempos T0, T1 e T2, 9 animais de cada tratamento foram sacrificados, com indução anestésica intraperitoneal (IP), utilizando-se pentobarbital sódico (6mg/100g de peso corpóreo), para coleta de sangue e do fígado. Os procedimentos foram realizados entre 7:00 e 10:00 horas.

Após o início do efeito anestésico, a pele ventral do rato foi debridada e feita uma incisão ao longo da linha alba. O sangue foi coletado por punção cardíaca e após coagulação, centrifugado a 3000 rpm (centrífuga refrigerada SORVAL RC5C - Du Pont Instruments) durante 10 minutos à 4°C, para obtenção do soro. Em um tubo de ensaio contendo 1 mg de oxalato de potássio e 1 mg de fluoreto de sódio, foi coletado 1mL de sangue e centrifugado nas mesmas condições da alíquota anterior, para determinação da glicose.

Imediatamente após a coleta de sangue, o fígado foi retirado, pesado e congelado para posteriores determinações químicas.

De 3 animais de cada tratamento, após anestesia, o fígado foi dissecado, porções do lobo Caudal foram seccionadas e colocadas em paraformaldeído 5%, tamponado com fosfato 0,2 M - pH 7,4, para estudos em

microscopia óptica (MO) e em tetróxido de ósmio (tampão Cacodilato 0,1M - pH 7,2) para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.5. Métodos analíticos

3.5.1. Análises realizadas no soro e no fígado

A dosagem de lipídios totais no soro foi feita através do método da Sulfofosfovanilina utilizando "kit" comercial da In Vitro Diagnóstica LTDA (CAT:026). O método se baseia no fato de que os lipídios em meio ácido, sob aquecimento, formam íons que reagem com o grupo carbonila da fosfovanilina formando um complexo de coloração rosa cuja intensidade é proporcional a quantidade de lipídios presentes nas amostras. A leitura da densidade óptica foi realizada em aparelho Selectra Vitalab, a 540 nm onde ocorre o pico de absorção. Os resultados foram expressos em mg/dL e as suas concentrações calculadas a partir do fator de calibração padrão.

Os lipídios totais de homogeneizado dos fígados foram extraídos pelo método BLIGH & DYER (1959), sendo a amostra homogeneizada com uma mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0,8. Uma alíquota do produto de extração contendo os lipídios foi evaporada até peso constante, em estufa a 100°C e os resultados calculados como percentagem do peso úmido das amostras.

3.5.1.1. Dosagem de triacilgliceróis e colesterol total

No soro a dosagem de triacilgliceróis (TAG) foi realizada através do método enzimático GPO-PAP utilizando um "kit" da Merck Darmstadt

(Merkotest). Por ação de lipases os triacilgliceróis são hidrolisados em glicerol e ácidos graxos livres; posteriormente o glicerol reage com a solução reativa produzindo cor. A leitura da densidade óptica foi feita em aparelho Selectra Vitalab, a 500nm sendo diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Para determinação do colesterol total no soro, foi utilizado o método colorimétrico CHOD-PAP, através de um "kit" da Boehringer Mannheim. As amostras foram lidas em comprimento de onda 546 nm, em aparelho Selectra Vitalab e os resultados foram expressos em mg/dL. A medida de TAG e colesterol total do fígado seguiu a mesma metodologia, após extração dos lipídios com isopropanol, pelo método de HAUG & HOSTMARK (1987).

3.5.1.2. Determinação da quantidade de proteína no soro e no fígado

A quantidade de proteína foi determinada tanto no soro quanto no fígado pelo método de LOWRY et al. (1951). O fígado foi homogeneizado e uma alíquota de 0,5g misturada com 4 mL de água deionizada. Desta mistura foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e colocadas em tubos com tampa contendo 0,4 mL de NaOH 1N, ficando por 12 horas em estufa a 40°C. No dia seguinte, alíquotas de 20 µL das amostras foram adicionadas a uma solução alcalina de sulfato de cobre que complexa-se com a proteína. O caráter redutor do reagente Folin-Ciocalteau, em meio básico, produz uma coloração azul proporcional à concentração de proteína da amostra; a determinação foi efetuada em leitura óptica de 700 nm, em aparelho Selectra Vitalab. A curva padrão foi de albumina bovina e os resultados expressos em g/dL no soro e mg/g no fígado.

3.5.1.3. Determinação da glicose

Imediatamente após retirada do fígado 0,5 g de amostra foi misturada com 2,4 mL de solução aquosa de KOH 30% e levado a banho maria por 30 minutos, com posterior extração alcoólica da glicose. Esta foi determinada por método enzimático, (Glicose GOD-ANA - Labtest) cujo princípio se baseia na oxidação da glicose catalisada pela glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase. Através da reação oxidativa de acoplamento forma a antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose da amostra. A leitura foi feita em aparelho Selectra Vitalab a 500 nm e os resultados expressos em mg/g. Para determinação no soro usou-se o mesmo processo expressando-se os resultados em mg/dL.

3.5.1.4. Determinação da atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada no soro através de um método colorimétrico pelo "Kit" Bayer EC3.1.3.1 Diagnostic Manufacturing S.A. O método segue as recomendações do Comitê Escandinavo de Enzimas (SCE) e baseia-se no princípio de que em presença da fosfatase alcalina ocorre hidrólise do p-nitrofenilfosfato em fosfato e p-nitrofenol. O composto foi lido em aparelho Selectra Vitalab no comprimento de onda de 405 nm em temperatura de 37o, e os resultados foram expressos em U/L.

3.5.1.5. Extração de lipídios e quantificação de ácidos graxos

A extração lipídica do fígado foi realizada segundo método BLIGH & DYER (1959), e a composição de ácidos graxos determinada por cromatografia gasosa. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram preparados de acordo com o método de HARTMAN & LAGO (1973).

A composição de ácidos graxos foi determinada usando cromatógrafo a gás (Varian, modelo 3400/3300), com detector de ionização de chama (FID), coluna OV275, 15% Carbo WX (1/8"X2,0m). A temperatura programada da coluna foi de 155 a 162°C na taxa de 3°C por minuto, a temperatura do detector foi de 300°C, do injetor 230°C e a vazão de gás de arraste de 30 mL/min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões (SIGMA CHEMICAL COMPANY - Lot: 89F-9012) e quantificados por cálculo automático de área, com integrador Perkin-Elmer LCI-100.

3.5.1.6. Estudos histológicos (MO)

Para microscopia óptica, as amostras de fígado fresco foram fixadas em solução de paraformaldeído 5% (2,5 g de paraformaldeído em 50 mL de tampão cacodilato de sódio, 0,2M) por 48 horas, seguida pela desidratação em série crescente de álcool etílico até o álcool absoluto, clarificação em xilol, impregnação em parafina/xilol com inclusão e emblocagem a 58°C, em "Paraplast plus" (mistura de parafina, polímeros plásticos e dimetil-sulfóxido). Os blocos foram cortados em espessura de 4 µm no micrótomo (Ancap, modelo 781) e cerca de 12 cortes foram colocados em cada lâmina. Após desparafinização com xilol, hidratação e coloração com Hematoxilina/Eosina (HE), ou após reação do ácido periódico-Schiff (PAS) foram fotografados no microscópio óptico Olympus-CBA com filme NEOPAN SS, branco e preto de 100 ASA. Para estudos histológicos, também foram utilizados cortes de 1 µm obtidos de material incluído em resina de Epoxi e corados com corante catiônico Azul de Toluidina.

3.5.1.7. Estudos ultraestruturais (MET)

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET) as amostras finamente fatiadas foram imediatamente fixadas em solução de glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,1M - pH 7,2 por 4 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, seguidas de desidratação em crescentes soluções alcoólicas finalizadas em acetona pura e embebidas em EPON 812 (TANAKA & MITSUSHIMA, 1984). Foram efetuados cortes ultrafinos com contraste de acetato de uranila segundo técnica de DREVON & HOVIG (1977) e fotografados em Microscópio Eletrônico (ZEISS EM 10C/CR) com aumentos de 2.500 a 80.000 vezes. Alguns fígados receberam perfusão de glutaraldeído a 2,5 % via portal. Entretanto, face aos resultados aparentemente similares, optou-se pela fixação por imersão apenas após coleta das amostras em superfície de parafina contendo gotas de fixador.

3.5.2. Análises realizadas nas dietas, fezes e urina

3.5.2.1. Proteína

A proteína bruta foi calculada multiplicando-se os teores de nitrogênio total obtidos pelo fator de conversão de nitrogênio para proteína 6,25. O nitrogênio total da dieta, fezes e urina foi determinado pelo método semimicro-Kjeldahl utilizando-se o sulfato de cobre e de potássio e o dióxido de titânio (WILLIAMS, 1973) como catalisadores.

3.5.2.2. Lipídios totais

Nas dietas e nas fezes os lipídios foram determinados pelo método BLIGH & DYER (1959), as amostras foram homogeneizadas em mistura de clorofórmio, metanol e água na proporção de 1:2:0,8. O método extrai todas as

classes de lipídios sem usar aquecimento. Os resultados foram expressos em percentagem.

3.5.2.3. Energia

A energia bruta das dietas e das fezes foi determinada em bomba calorimétrica adiabática - PARR 1261; o calor de combustão da amostra foi comparado com o padrão de ácido benzóico e o resultado expresso em quilocalorias (SILVA, 1981).

Com estes valores foi calculada a quantidade de energia ingerida e a excretada pelas fezes. A estimativa da energia absorvida foi aparente uma vez que não foi levada em consideração a perda de energia pela urina.

3.5.3. Avaliação da qualidade nutricional das dietas

As avaliações foram feitas mantendo os animais em gaiolas metabólicas individuais por 11 dias, sendo 3 de adaptação e 8 de coleta de fezes e urina, com dieta e água ad libitum. Foram determinados ganho de peso, consumo de dieta e excreção de nitrogênio. Os 9 animais de cada tratamento foram pesados a cada 3 dias sendo feita, concomitantemente, a medida de consumo e a troca de água.

Através do balanço de nitrogênio, determinou-se a quantidade de nitrogênio ingerido pelo consumo de alimento e do excretado através do nitrogênio da urina e das fezes (SGARBIERI, 1987), calculou-se a digestibilidade verdadeira (Dv) conforme descrito por WOLZAK et al. (1981) e LIENER et al. (1980), o valor biológico (VB) segundo MITCHELL (1924) e NPR (Net Protein Ratio) conforme MILLER & BENDER (1955).

No final da coleta de dados o valor da Razão da Eficiência Protéica Operacional (PERop) foi calculado para cada animal fazendo-se

posteriormente a média para cada tratamento, segundo procedimento 43.183-43.187 da AOAC (1980). Calculou-se também o ganho de peso semanal dos ratos para elaboração da curva de crescimento.

O controle de peso dos animais e o consumo da dieta permitiu o cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) mostrando a relação entre ganho de peso e consumo de dieta (PELLET & YOUNG, 1980).

Todos os índices foram calculados individualmente para cada animal, permitindo o cálculo do valor da média e do desvio padrão para cada grupo experimental.

3.5.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado em esquema fatorial (BENDER et al., 1982). Todos os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão.

As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. Para analisar as diferenças nos níveis e tipos de gordura adicionadas às rações de cada tratamento foi calculado o coeficiente de correlação linear entre as variáveis estudadas. Para tanto foi utilizado o programa SANEST (Sistema de Análise Estatística), elaborado por ZONTA & MACHADO (1989).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação nutricional

4.1.1. *Ganho de peso e consumo*

Ratos Wistar, recém desmamados, foram alimentados por trinta dias com dietas distintas em tipo, e quantidade de gordura; também havia um grupo com gordura igual ao do controle mas sem fonte protéica. Não foi observado nenhum efeito adverso visível; o aspecto saudável dos animais indicou que tanto o estado sanitário como o manejo foram eficientes e que o excesso de lipídios no alimento não alterou aparentemente a saúde dos ratos. O grupo que não recebeu proteína na dieta (APROT) estava magro, agressivo, com pelo arrepiado e sem brilho; no entanto, estes e os demais animais sobreviveram até o final do experimento.

O ganho de peso e o consumo alimentar dos animais experimentais, aos 15 e aos 30 dias do experimento, encontram-se na Tabela 7. O tipo ou a quantidade de gordura da dieta não influenciou significativamente, durante os primeiros 15 dias, sobre o ganho de peso corporal, embora o grupo controle (CASIN-7/7= AIN 93) tenha apresentado peso superior, ao redor de 10%, em relação aos demais grupos.

Tabela 7 - Média (\pm Desvio Padrão) do Ganho de Peso e do Consumo de dieta dos ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)

TRATAMENTO	GANHO DE PESO (g)		CONSUMO (g)	
	15 dias	30 dias	15 dias	30dias
CASIN-7/7	86,10 \pm 7,39	171,23 \pm 3,98 ^a	164,62 \pm 3,97	425,12 \pm 16,10 ^a
CASSA-7/7	76,94 \pm 11,38	161,88 \pm 6,90 ^a	164,30 \pm 17,26	423,48 \pm 15,13 ^a
CASIN-30/30	79,04 \pm 9,47	174,22 \pm 9,83 ^a	124,35 \pm 11,75	353,03 \pm 21,04 ^c
CASSA-30/30	77,93 \pm 18,46	169,05 \pm 18,19 ^a	130,10 \pm 20,10	360,13 \pm 24,96 ^c
CASIN-30/5	-	165,47 \pm 17,28 ^a	-	397,02 \pm 18,42 ^b
CASSA-30/5	-	152,87 \pm 9,90 ^b	-	382,72 \pm 18,42 ^b

Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%.

Pela curva de crescimento semanal (Figura 6) pode-se observar que o ganho de peso do grupo CASIN-30/30 foi maior e que o CASSA-30/5 mostrou um ganho inferior aos demais grupos, embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, nos primeiros 15 dias.

Quanto ao consumo houve redução, estatisticamente significativa ao nível de 5%, na quantidade de ingesta dos grupos experimentais que consumiram alta concentração de gordura na dieta (CASIN-30/30 e CASSA-30/30) nos primeiros quinze dias, independente do tipo de lipídio usado. Este fato influenciou no coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e na razão da eficiência protéica líquida (NPR) (Tabela 8) que mostraram resultados com diferenças significativas entre os níveis, mas não entre os tipos de gorduras utilizadas nas dietas.

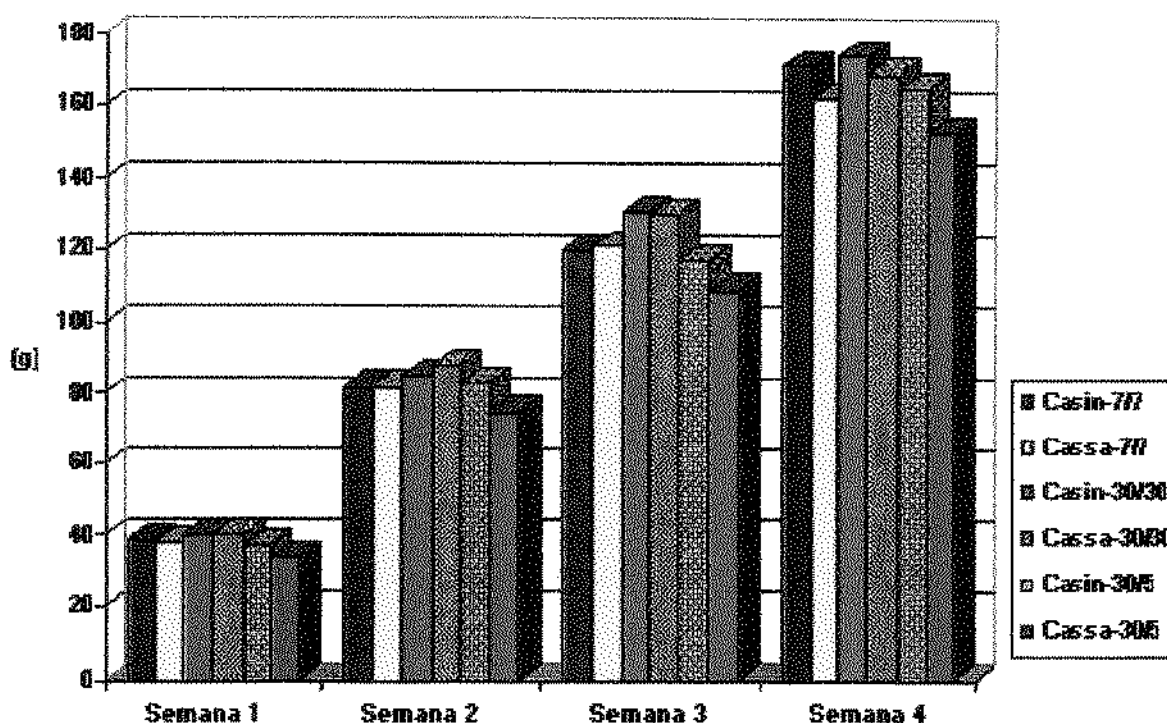


Figura 6 - Medida do Ganho de Peso Semanal de ratos Wistar, em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas.

No final do experimento, com a presença dos grupos recuperados (CASIN-30/5 e CASSA-30/5), observaram-se diferenças significativas para o ganho de peso. O grupo de animais que ganhou menor peso ($152,87 \pm 9,90$ g) foi o CASSA-30/5 que mostrou diferença significativa em relação a CASIN-30/30 e a CASSA-30/30 mas foi semelhante aos demais grupos experimentais. No aspecto referente ao consumo, houve diferença estatística entre os grupos que receberam níveis diferentes de gordura na dieta, independente do tipo de lipídio consumido.

4.1.2. CEA, PERop e NPR

Na Tabela 8 o CEA ,aos 30 dias (T2), indicou maior eficiência para os grupos CASIN-30/30 e CASSA-30/30, não ocorrendo distinção entre os grupos

com 7% de gordura (CASIN-7/7 e CASSA-7/7) e os grupos recuperados (CASIN-30/5 e CASSA-30/5). O PERop dos tratamentos CASIN-30/5 e CASSA-30/5 apresentou melhor resposta, juntamente com os grupos com 30% de gordura na dieta (CASIN-30/30 e CASSA-30/30), sem diferir, no entanto dos grupos CASIN-7/7 e CASSA-7/7.

A Razão de Eficiência Protéica Líquida (NPR) comportou-se de maneira similar ao CEA e PERop, mostrando diferença estatisticamente significativa entre o níveis de gordura utilizada na dieta mas não entre os tipos.

Os animais que receberam gordura de coco na dieta (grupos CASSA), apesar de não mostrarem diferenças significativas dos que receberam óleo de soja (grupos CASIN) apresentaram, ao 15^o e ao 30^o dia, menor ganho de peso (Figura 6).

Tabela 8 - Média (\pm Desvio Padrão) do Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), da Razão da Eficiência Protéica operacional (PERop), da Razão da Eficiência Protéica Líquida (NPR) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)

TRATAMENTO	CEA		PERop	NPR
	15 dias	30 dias	30 dias	10 dias
CASIN-7/7	0,52 \pm 0,03 ^b	0,40 \pm 0,02 ^b	2,26 \pm 0,07 ^b	3,40 \pm 0,17 ^b
CASSA-7/7	0,47 \pm 0,02 ^b	0,38 \pm 0,02 ^b	2,25 \pm 0,09 ^b	3,08 \pm 0,12 ^b
CASIN-30/30	0,63 \pm 0,04 ^a	0,50 \pm 0,01 ^a	2,66 \pm 0,18 ^a	4,14 \pm 0,21 ^a
CASSA-30/30	0,60 \pm 0,06 ^a	0,47 \pm 0,03 ^a	2,67 \pm 0,13 ^a	3,92 \pm 0,38 ^a
CASIN-30/5		0,42 \pm 0,04 ^b	2,44 \pm 0,10 ^{a b}	-
CASSA-30/5		0,40 \pm 0,01 ^b	2,34 \pm 0,11 ^{a b}	-

Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%.

4.1.3. Digestibilidade verdadeira, valor biológico, utilização líquida da proteína e balanço nitrogenado

Visando avaliar o aproveitamento protéico das dietas, em presença de seus teores de gordura, comparou-se os percentuais calculados para a digestibilidade verdadeira (Dv), o valor biológico (VBv), a utilização líquida da proteína (NPU) e o balanço de nitrogênio (BN).

Os resultados obtidos na Tabela 9 demonstraram que a quantidade ou qualidade dos lipídios ingeridos não influíram estatisticamente no valor biológico da proteína usada (Caseína), embora o balanço nitrogenado tenha apresentado valores mais altos para os grupos de ratos que consumiram níveis menores de gordura, independente do tipo (CASIN-7/7 ou CASSA-7/7).

Os animais experimentais apresentaram balanço de nitrogênio (BN) positivo com médias maiores, estatisticamente significativas, para os grupos CASIN-7/7 e CASSA-7/7. As médias do BN não diferiram se comparadas entre si quanto ao tipo de gordura usada, mostrando que as dietas e seus distintos tipos de gordura não foram suficientes para alterar o equilíbrio nitrogenado (Tabela 9).

Tabela 9 - Média (\pm Desvio Padrão) da Digestibilidade Verdadeira (Dv), do Valor Biológico (VBv), da Utilização Líquida da Proteína (NPU) e do Balanço Nitrogenado (BN) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)

TRATAMENTO	Dv(%)	VB (%)	NPU(%)	BN
CASIN-7/7	96,02 \pm 0,66 ^a	87,31 \pm 6,98 ^a	83,35 \pm 6,57 ^a	3,05 \pm 0,28 ^a
CASSA-7/7	95,60 \pm 1,35 ^a	89,40 \pm 4,88 ^a	85,44 \pm 4,34 ^a	3,05 \pm 0,29 ^a
CASIN-30/30	96,63 \pm 0,33 ^a	85,89 \pm 4,34 ^a	82,99 \pm 4,10 ^a	2,25 \pm 0,25 ^b
CASSA-30/30	97,42 \pm 0,69 ^a	86,44 \pm 7,67 ^a	84,24 \pm 7,91 ^a	2,45 \pm 0,38 ^b

Médias da mesma coluna seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%.

4.1.4. Energia das dietas

Os resultados obtidos pela determinação na bomba calorimétrica (BC) e o cálculo teórico (CT) da distribuição de energia nas dietas, discriminadas em valores de acordo com a quantidade de proteína, de hidrato de carbono e de lipídio estão na Tabela 10.

Nas dietas chamadas hiperlipídicas (CASIN-30/30 e CASSA-30/30) a gordura das fórmulas fornece a maioria das calorias enquanto nos demais tratamentos a maior parte da energia ($\pm 65\%$) é fornecida pelos hidratos de carbono. A energia fornecida pela proteína manteve-se relativamente constante em todos os tratamentos. Na dieta aprotéica 84% da energia foi fornecida pelos hidratos de carbono e 16% por lipídios.

Tabela 10 - Energia das Dietas dos animais experimentais: Determinadas na Bomba Calorimétrica (EBC), Calculadas (EC) em relação a quantidade de nutrientes presentes nas fórmulas, expressa em kcal/100g e em percentagem da energia total calculada.

TRATAMENTO	EBC	EC	% E. PROT.	% E. HC	% E. LP.
	kcal/100g				
CASIN-7/7	431,7	431,4	22	63	15
CASSA-7/7	428,4	423,0	23	64	13
CASIN-30/30	561,6	552,1	17	32	51
CASSA-30/30	519,9	516,2	19	33	48
CASIN-30/5	417,8	420,8	23	66	11
CASSA-30/5	416,1	414,8	23	67	10
APROT	398,1	405,8	-	84	16

4.1.5. Consumo, excreção, absorção de energia e lipídios

A medida do consumo de alimento e a coleta de fezes, por um período de 11 dias, permitiu o cálculo do consumo, da excreção e da absorção de energia e de lipídios.

A energia digestível (ED) obtida pela diferença entre a ingerida e a excretada ($ED=A-B$) estão na Tabela 11. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na energia consumida, excretada ou digestível entre os tratamentos, excetuando-se o grupo APROT que consumiu 40% menos, excretou 33% menos e teve uma média de ED 36% menor do que a média dos demais grupos experimentais.

Os grupos que apresentaram maior consumo e energia digestível foram o CASIN-7/7 e CASSA-30/30. No aspecto referente à excreção observou-se que os grupos que excretaram menor energia foram os grupos que consumiram maior quantidade de energia nas dietas.

Tabela 11 - Média (\pm Desvio Padrão) do Consumo de Energia, de sua Absorção e de Energia Digestível (ED), expressa em kcal, medidos em ratos submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)

TRATAMENTO	CONSUMO	EXCREÇÃO	ENERG. DIGEST.
	A	B	A-B
CASIN -7/7	588,67 \pm 28,16 ^a	35,50 \pm 4,68 ^a	553,17 \pm 24,61 ^a
CASSA -7/7	577,00 \pm 68,48 ^a	36,50 \pm 7,06 ^a	540,50 \pm 68,37 ^a
CASIN -30/30	574,33 \pm 62,27 ^a	33,67 \pm 3,08 ^a	541,00 \pm 55,19 ^a
CASSA - 30/30	587,00 \pm 2,28 ^a	29,67 \pm 5,68 ^a	557,33 \pm 96,79 ^a
APROT	207,83 \pm 17,94 ^b	11,33 \pm 1,75 ^b	196,50 \pm 16,54 ^b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%.

O consumo, a excreção e a absorção de lipídios (Tabela 12) mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis, mas não entre os tipos de gordura. Nos grupos CASIN-30/30 e CASSA-30/30 houve distinção na excreção, mas o consumo e absorção de ambos foi semelhante.

4.2. Efeito da gordura ingerida na dieta sobre os parâmetros sanguíneos

4.2.1. Lipídios

O tempo, níveis e tipos de gordura consumida na dieta influenciaram na concentração de lipídios totais do soro sanguíneo (Tabela 13). Os grupos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos demais, com menor e maior concentração de lipídios no soro sanguíneo, foram: o recém desmamado (RD), considerado tempo zero (T0) com 244 ± 20 mg/dL e o CASIN-30/30, aos quinze dias de tratamento (T1), com 607 ± 48 mg/dL, que não diferiu do grupo CASSA-7/7 (554 ± 41 mg/dL) aos 30 dias do experimento, considerado tempo dois (T2).

Os valores de T1, que aparecem da Tabela 13 até a Tabela 26 entre parênteses, são repetições de CASIN-30/30 e de CASSA-30/30 pois neste período os grupos CASIN-30/5 e CASSA-30/5 receberam o mesmo tipo de ração.

Tabela 12 - Média (\pm Desvio Padrão) de Consumo de Lipídios, sua Excreção fecal, Cálculo da Digestibilidade Aparente (Da) nos ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas (n=6)

TRATAMENTO	CONSUMO (g)	EXCREÇÃO (g)	Da
CASIN-7/7	9,55 \pm 0,46 ^b	0,30 \pm 0,07 ^c	96,86 ^a
CASSA-7/7	9,43 \pm 1,12 ^b	0,37 \pm 0,14 ^c	96,08 ^a
CASIN-30/30	30,67 \pm 3,32 ^a	0,76 \pm 0,13 ^a	97,52 ^a
CASSA-30/30	32,43 \pm 5,65 ^a	0,57 \pm 0,12 ^b	98,24 ^a
APROT	3,66 \pm 0,32 ^c	0,09 \pm 0,07 ^d	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%

Tabela 13 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/dL, de Lipídios Totais (LT) do soro sangüíneo de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	467 \pm 37 ^{d e}	425 \pm 25 ^{e f}
CASSA -7/7	-	480 \pm 34 ^{c d e}	554 \pm 41 ^{a b}
CASIN -30/30	-	607 \pm 48 ^a	366 \pm 32 ^f
CASSA -30/30	-	518 \pm 37 ^{b c d}	431 \pm 36 ^{e f}
CASIN - 30/5	-	(607 \pm 48) ^a	461 \pm 30 ^{d e}
CASSA - 30/5	-	(518 \pm 37) ^{b c d}	540 \pm 36 ^{b c}
RD	244 \pm 20 ^g	-	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 66,40

O controle (CASIN-7/7) apresentou um pequeno decréscimo, sem significância estatística, do T1 para o T2, ocorrendo o inverso com o grupo CASSA-7/7, que aumentou significativamente a concentração de lipídios sanguíneos, quando aumentou o tempo de consumo de gordura. Os grupos

que consumiram altos teores de gordura, independente do tipo, diminuíram a quantidade de lipídios do sangue com o tempo de consumo. Mas quando os dois grupos foram recuperados, diminuindo-se a quantidade de gordura de 30% para 5%, houve uma mudança no comportamento dos lipídios. O grupo CASIN-30/5 reduziu os lipídios mas não na mesma proporção que os que continuaram recebendo a dieta CASIN-30/30 e o CASSA-30/5 aumentou a concentração de lipídios no soro sanguíneo, embora sem significância estatística, quando a dieta hiperlipídica foi substituída por uma de baixa concentração de gordura de coco.

Os lipídios da dieta apresentaram concentrações distintas de triacilgliceróis (TAG) no soro sanguíneo (Tabela 14). De T1 para T2 ocorreram diferenças estatisticamente significativas no nível de TAG dos grupos que consumiram óleo de soja (CASIN) em qualquer nível. Ocorreu o mesmo fenômeno com os grupos que consumiram gordura de coco mas só no nível de 30%. Entretanto nos grupos CASSA-7/7 e o recuperado (CASSA-30/5) houve uma discreta mas não significativa elevação.

Os grupos que obtiveram menores médias foram o recém desmamado (RD), no tempo zero (T0) e APROT, CASIN-7/7 e CASIN-30/30 no tempo um (T1), com valores entre $33 \pm 6,46$ mg/dL para o APROT e $58 \pm 2,80$ mg/dL para o grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa.

Tabela 14 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/dL, de Triacilgliceróis (TAG) do soro sangüíneo de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS - T2
CASIN -7/7	-	58 \pm 2,80 ^{c d e}	156 \pm 40,91 ^a
CASSA -7/7	-	78 \pm 7,66 ^{b c d}	86 \pm 8,64 ^{b c}
CASIN -30/30	-	38 \pm 5,91 ^e	104 \pm 11,47 ^b
CASSA -30/30	-	78 \pm 7,97 ^{b c d}	155 \pm 30,77 ^a
CASIN - 30/5	-	(38 \pm 5,91) ^e	143 \pm 23,27 ^a
CASSA - 30/5	-	(78 \pm 7,97) ^{b c d}	80 \pm 8,29 ^{b c d}
RD	42 \pm 3,39 ^{d e}	-	-
APROT	-	33 \pm 6,46 ^e	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 34,77.

No aspecto referente ao colesterol total (CT), apresentado na Tabela 15, os resultados mostraram que com o tempo de consumo (de T1 para T2) houve redução, embora não significativa, no nível de CT com exceção dos grupos CASIN-7/7 e CASIN-30/30 que aumentaram com significância estatística.

Os grupos que apresentaram menores médias foram o APROT, CASIN-7/7, CASSA-7/7 e CASIN-30/30 aos 15 dias do experimento (T1) e CASSA-7/7 e CASIN-30/30 no final do experimento (T2).

Tabela 15 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/dL, de **Colesterol Total (CT)** do soro sanguíneo de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	55 \pm 3,93 ^e	76 \pm 3,49 ^{a b}
CASSA -7/7	-	63 \pm 4,69 ^{c d e}	56 \pm 6,38 ^{d e}
CASIN -30/30	-	62 \pm 9,31 ^{c d e}	59 \pm 3,27 ^{c d e}
CASSA -30/30	-	77 \pm 5,89 ^a	66 \pm 3,54 ^{b c d}
CASIN - 30/5	-	(62 \pm 9,31) ^{c d}	76 \pm 5,86 ^{a b}
CASSA - 30/5	-	(77 \pm 5,89) ^a	66 \pm 4,49 ^{b c d}
RD	69 \pm 2,62 ^{a b c}	-	-
APROT	-	53 \pm 5,19 ^e	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 10,19.

4. 2.2. Proteínas totais

As proteínas totais (PT) do soro sanguíneo (Tabela 16) permaneceram ao redor de 5g/dL para os tratamentos exceto para o grupo APROT (3,48 \pm 0,41 g/dL), sendo esta a mais baixa encontrada e 36% menor do que a média dos demais tratamentos. Em T1 não apareceu diferença estatística entre os tratamentos mas em T2 o grupo CASIN-7/7 e CASIN-30/5 mostraram maiores médias. No aspecto tempo, verificou-se que de T1 para T2 houve um ligeiro aumento, sem significância estatística, exceto para o grupo CASIN-30/5 que demonstrou esta diferença.

Tabela 16 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em g/dL de Proteínas Totais (PT) do soro sangüíneo de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO - T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS - T2
CASIN -7/7	-	5,53 \pm 0,26 ^{a b c}	5,92 \pm 0,28 ^a
CASSA -7/7	-	5,07 \pm 0,15 ^{b c d}	5,33 \pm 0,26 ^{a b c}
CASIN -30/30	-	5,00 \pm 0,14 ^{c d}	5,22 \pm 0,13 ^{b c}
CASSA -30/30	-	5,27 \pm 0,41 ^{b c}	5,65 \pm 0,37 ^{a b}
CASIN - 30/5	-	(5,00 \pm 0,14) ^{c d}	5,90 \pm 0,31 ^a
CASSA - 30/5	-	(5,27 \pm 0,41) ^{b c}	5,60 \pm 0,45 ^{a b c}
RD	4,58 \pm 0,27 ^{c d}	-	-
APROT	-	3,48 \pm 0,41 ^c	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 0,60

4.2.3. Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina (PA) sérica apresentou resultados semelhantes no T0 e no T1, em todos os grupos (Tabela 17) exceto para o APROT, que teve sua concentração reduzida em 41% com relação à média dos demais grupos no T1.

Houve um decréscimo estatisticamente significativo na atividade da PA de T1 para T2 em todos os tratamentos, entretanto estas diferenças não apareceram quando os tratamentos foram comparados entre si dentro do T2. O grupo APROT em T1 não mostrou diferença significativa do CASSA-30/5, apesar da atividade da fosfatase alcalina estar 18% mais baixa.

No T1, maior atividade de fosfatase alcalina foi encontrada no grupo CASIN-30/30 e a menor no grupo APROT.

Tabela 17 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em U/L, de Fosfatase Alcalina (PA) do soro sanguíneo de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	516 \pm 46,38 ^{b c}	413 \pm 31,36 ^d
CASSA -7/7	-	586 \pm 30,69 ^{a b}	444 \pm 43,50 ^{c d}
CASIN -30/30	-	593 \pm 50,22 ^a	425 \pm 38,90 ^d
CASSA -30/30	-	581 \pm 48,83 ^{a b}	447 \pm 34,20 ^{c d}
CASIN - 30/5	-	(593 \pm 50,22) ^a	426 \pm 37,66 ^d
CASSA - 30/5	-	(581 \pm 48,83) ^{a b}	412 \pm 36,71 ^{d e}
RD	550 \pm 31,69 ^{a b}	-	-
APROT	-	337 \pm 26,19 ^e	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 76,12.

4.2.4. Glicose

Na Tabela 18, onde encontram-se os níveis sanguíneos de glicose, pode-se observar a mais baixa concentração (55 \pm 6,62 mg/dL) no tratamento CASIN-30/30, do T1, e a mais alta (126 \pm 19,97 mg/dL) no CASSA-7/7 do T2. O grupo RD (T0) e o APROT (T1) obtiveram médias de glicose muito semelhantes entre si e maiores que a dos demais tratamentos no T1. Quando os resultados foram analisados dentro dos tempos, observou-se que de T1 para T2 houve aumento significativo em todos os tratamentos. Dentro do T2 a maior média foi para o tratamento CASSA-7/7 que apresentou a maior média.

Tabela 18 - Média (\pm Desvio Padrão) expressa em mg/dL de Glicose Plasmática (GP) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	58 \pm 2,48 ^{fg}	106 \pm 8,69 ^{abc}
CASSA -7/7	-	73 \pm 9,45 ^{efg}	126 \pm 19,97 ^a
CASIN -30/30	-	55 \pm 6,62 ^g	102 \pm 8,19 ^{bc}
CASSA -30/30	-	77 \pm 5,92 ^{def}	98 \pm 9,95 ^{bc}
CASIN - 30/5	-	(55 \pm 6,62) ^g	96 \pm 2,23 ^{bcd}
CASSA - 30/5	-	(77 \pm 5,92) ^{def}	112 \pm 20,10 ^{ab}
RD	90 \pm 6,34 ^{cde}	-	-
APROT	-	88 \pm 5,75 ^{cde}	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 20,44.

4.3. Resposta hepática ao consumo de diferentes tipos e níveis de gordura na dieta

4.3.1. Peso do fígado

O peso do fígado expresso como percentagem do peso corporal (Tabela 19), manteve-se relativamente constante, exceto para o grupo APROT que mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais tratamentos, tanto dentro do nível como do tipo de gordura utilizado na dieta e, também, dentro do tempo. Apesar de não mostrarem diferenças significativas, os grupos que receberam 30% de gordura na dieta, obtiveram, tanto no T1 como no T2, médias mais altas do que os demais grupos.

O tempo, os níveis ou o tipo de gordura não influenciaram no peso dos fígados dos animais experimentais.

Tabela 19 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em percentagem, do Peso do Fígado relacionada ao peso corporal (PF/PC) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	3,16 \pm 0,18 ^b	3,14 \pm 0,19 ^b
CASSA -7/7	-	3,16 \pm 0,16 ^b	3,13 \pm 0,20 ^b
CASIN -30/30	-	3,30 \pm 0,11 ^b	3,36 \pm 0,29 ^b
CASSA -30/30	-	3,38 \pm 0,18 ^b	3,35 \pm 0,38 ^b
CASIN - 30/5	-	(3,30 \pm 0,11) ^b	3,16 \pm 0,22 ^b
CASSA - 30/5	-	(3,38 \pm 0,18) ^b	3,26 \pm 0,19 ^b
RD	3,52 \pm 0,06 ^b	-	-
APROT	-	4,11 \pm 0,41 ^a	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 0,47

4.3.2. Lipídios

A maior concentração de lipídios totais (Tabela 20) esteve presente no fígado dos ratos APROT com diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%. Em relação ao tempo, a menor média (4,57 \pm 0,29) ocorreu no grupo RD (T0). Aumentou para T1, diminuiu em T2 para os níveis de 7% e 5% e continuou aumentando para os grupos de 30%, independente do tipo de gordura utilizada na dieta.

No T2, as médias dos tratamentos com nível de 7% e 5% de gordura na dieta não mostraram diferença significativa entre si. No entanto, os grupos que

receberam 30% de lipídios apresentaram esta diferença para o tipo de gordura. Observou-se ainda que em todos os tratamentos e níveis, os lipídios totais encontrados no fígado foram mais baixos para os grupos alimentados com gordura de coco na dieta (CASSA), quando comparados aos de mesmos níveis de óleo de soja (CASIN).

Tabela 20 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em percentagem, de Lipídios Totais (LT) encontrados no fígado de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	7,56 \pm 0,79 ^{cd}	6,14 \pm 0,51 ^{def}
CASSA -7/7	-	5,98 \pm 0,43 ^{def}	5,23 \pm 0,54 ^{ef}
CASIN -30/30	-	8,93 \pm 1,80 ^c	11,8 \pm 1,14 ^b
CASSA -30/30	-	6,55 \pm 0,96 ^{de}	9,17 \pm 1,00 ^c
CASIN - 30/5	-	(8,93 \pm 1,80) ^c	6,00 \pm 0,25 ^{def}
CASSA - 30/5	-	(6,55 \pm 0,96) ^{de}	4,88 \pm 0,56 ^{def}
RD	4,57 \pm 0,29 ^f	-	-
APROT	-	13,87 \pm 1,50 ^a	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 1,84

Os TAG (Tabela 21), estiveram em níveis mais baixos, com diferença estatisticamente significativa, nos grupos CASSA, níveis mais altos no grupo APROT, seguidos pelo CASIN-30/30 (T2) e em maior concentração nos fígados de ratos alimentados com 30% de gordura, independente do tipo. Para os grupos recuperados (CASIN-30/5 e CASSA-30/5, em T2) houve a respectiva queda de 56% e 66% de TAG hepáticos, quando as rações que

continham 30% de gordura foram substituídas pelas mesmas dietas com 5% de lipídios na sua fórmula.

No tempo 2 o grupo CASIN-7/7 obteve média muito semelhante ao CASIN-30/5, ocorrendo o mesmo fenômeno para o grupo CASSA-7/7 e CASSA-30/5.

Tabela 21 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/g, de Triacilgliceróis (TAG) encontrados no fígado de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	36,03 \pm 3,99 ^{de}	20,95 \pm 1,52 ^f
CASSA -7/7	-	17,36 \pm 2,63 ^{fg}	11,80 \pm 1,57 ^{gh}
CASIN -30/30	-	47,31 \pm 5,67 ^c	69,65 \pm 7,31 ^b
CASSA -30/30	-	29,53 \pm 2,53 ^e	42,60 \pm 2,50 ^{cd}
CASIN - 30/5	-	(47,31 \pm 5,67) ^c	20,85 \pm 1,80 ^f
CASSA - 30/5	-	(29,53 \pm 3,53) ^e	10,11 \pm 1,60 ^{hi}
RD	4,54 \pm 0,62 ⁱ	-	-
APROT	-	86,55 \pm 5,80 ^a	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 7,09

O nível de colesterol hepático (Tabela 22) mostrou-se inferior nos grupos que consumiram gordura de coco embora esta diferença só tenha obtido significância estatística, no T2, para o grupo CASIN-30/30 que mostrou a maior média (6,57 \pm 0,53 mg/g), no CASSA-30/30 (2,66 \pm 0,30 mg/g) e CASSA-30/5 (2,76 \pm 0,32 mg/g).

O grupo de animais que apresentou a menor concentração hepática de colesterol foi o RD (2,28 \pm 0,14 mg/g), não diferindo, no entanto, dos grupos

CASSA-7/7, no T1, e só diferindo do CASIN-30/30 no T2 que apresentou a maior média.

O CASIN-30/30 foi o único grupo que aumentou, com diferença estatisticamente significativa, a concentração de colesterol total de T1 para T2, onde apresentou a maior média.

Tabela 22 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/g, de **Colesterol Total (CT)** encontrado no fígado de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	4,35 \pm 0,24 ^{bc}	3,50 \pm 0,28 ^{bcd}
CASSA -7/7	-	3,57 \pm 0,48 ^{bcd}	3,43 \pm 0,27 ^{bcd}
CASIN -30/30	-	4,72 \pm 0,77 ^{bc}	6,57 \pm 0,53 ^a
CASSA -30/30	-	4,48 \pm 0,80 ^{bc}	2,66 \pm 0,30 ^{cd}
CASIN - 30/5	-	(4,72 \pm 0,77) ^{bc}	3,81 \pm 0,32 ^{bcd}
CASSA - 30/5	-	(4,48 \pm 0,80) ^{bc}	2,76 \pm 0,32 ^{cd}
RD	2,28 \pm 0,14 ^d	-	-
APROT	-	4,19 \pm 0,60 ^{bc}	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 1,81.

4.3.3. Proteína

Os resultados referentes à percentagem de proteína hepática podem ser vistos na Tabela 23, e mostraram que as maiores concentrações estão no T1 e nos grupos com 7% de gordura na dieta, independente do tipo de lipídio consumido. Nenhuma diferença estatisticamente significativa apareceu entre os tratamentos no T2, do RD (T0) e do APROT (T1).

Tabela 23 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em percentagem, de **Proteínas Totais (PT)** encontradas no fígado de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	41,16 \pm 1,79 ^a	27,52 \pm 4,12 ^b
CASSA -7/7	-	41,74 \pm 2,84 ^a	22,35 \pm 3,92 ^b
CASIN -30/30	-	37,09 \pm 4,44 ^a	21,52 \pm 1,21 ^b
CASSA -30/30	-	37,00 \pm 4,27 ^a	25,06 \pm 3,31 ^b
CASIN - 30/5	-	(37,09 \pm 4,44) ^a	23,18 \pm 3,22 ^b
CASSA - 30/5	-	(37,00 \pm 4,27) ^a	22,67 \pm 3,42 ^b
RD	20,84 \pm 2,19 ^b	-	-
APROT	-	27,91 \pm 3,50 ^b	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 8,84

4.3.4. Glicose

As médias de glicose, determinadas no fígado e expressas em mg/g, encontram-se na Tabela 24. Tanto no T1 quanto no T2, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos mas sim entre os níveis de gordura. Os tratamentos com maior concentração de gordura na dieta, no T2, e o grupo APROT, no T1, obtiveram as maiores médias, sem diferenças significativas entre si. Também observou-se aumento significativo do T1 para o T2 dentro do mesmo tratamento, excetuando-se os animais recuperados (CASIN-30/5 e CASSA-30/5) que mantiveram médias semelhantes nos dois tempos.

Tabela 24 - Média (\pm Desvio Padrão), expressa em mg/g, de Glicose encontrada no fígado (GF) de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em 3 diferentes tempos do experimento (n=6)

TRATAMENTO	TEMPO ZERO -T0	TEMPO UM - T1	TEMPO DOIS T2
CASIN -7/7	-	1,98 \pm 0,25 ^f	7,26 \pm 1,55 ^{b c}
CASSA -7/7	-	3,09 \pm 0,39 ^{e f}	8,38 \pm 1,26 ^b
CASIN -30/30	-	5,77 \pm 1,04 ^{c d}	11,02 \pm 1,58 ^a
CASSA -30/30	-	7,51 \pm 1,53 ^{b c}	10,70 \pm 0,83 ^a
CASIN - 30/5	-	(5,77 \pm 1,04) ^{c d}	5,08 \pm 0,63 ^{d e}
CASSA - 30/5	-	(7,51 \pm 1,53) ^{b c}	7,21 \pm 1,36 ^{b c d}
RD	6,18 \pm 0,45 ^{c d}	-	-
APROT	-	9,11 \pm 1,24 ^{a b}	-

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado DMS 5% = 2,15

4.3.1. Perfil de ácidos graxos

As quantidades de ácidos graxos determinadas nas gorduras utilizadas para a formulação das dietas encontram-se na Tabela 4. A concentração de ácidos graxos é distinta, conforme o esperado para óleo de soja e gordura de coco. A maior diferença entre os dois tipos de gordura está na concentração de ácido láurico (48% na gordura de coco) e de ácido linoléico (53% no óleo de soja). As diferenças restantes estão nas concentrações de ácidos mirístico, oléico e linoléico.

Na Tabela 25 encontram-se os perfis dos ácidos graxos dos fígados de ratos em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, aos 30 dias do período experimental. Analisando sob o aspecto do ácido mirístico (C14), verificou-se que em todos os grupos CASSA houve uma redução na sua quantidade em relação ao consumido na dieta. Entretanto, os grupos CASIN

Tabela 25 - Média (\pm Desvio Padrão) de ácidos graxos, determinados por cromatografia gasosa, em g/100g na gordura do fígado de ratos SPF em crescimento, submetidos a dietas normo e hiperlipídicas, em T2.

TRATAMENTO	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
CASIN - 7/7	0,55 \pm 0,11 ^{c,d}	27,71 \pm 0,58 ^{b,c}	17,46 \pm 2,64 ^c	21,21 \pm 1,92 ^d	26,67 \pm 1,74 ^b
CASSA - 7/7	1,86 \pm 0,37 ^b	30,32 \pm 1,15 ^a	22,39 \pm 1,77 ^b	28,22 \pm 3,04 ^{b,c}	9,95 \pm 1,74 ^d
CASIN - 30/30	0,30 \pm 0,04 ^d	17,30 \pm 1,16 ^e	9,88 \pm 1,98 ^{d,e}	17,25 \pm 1,16 ^d	48,90 \pm 1,78 ^a
CASSA - 30/30	5,62 \pm 0,78 ^e	28,51 \pm 0,64 ^{a,b}	12,51 \pm 2,42 ^d	35,55 \pm 3,09 ^a	8,40 \pm 0,70 ^d
CASIN - 30/5	0,50 \pm 0,08 ^{c,d}	25,32 \pm 1,99 ^d	17,35 \pm 1,65 ^c	20,43 \pm 2,60 ^d	27,96 \pm 5,51 ^b
CASSA - 30/5	1,75 \pm 0,22 ^b	27,23 \pm 0,44 ^{b,c,d}	22,24 \pm 1,72 ^b	26,31 \pm 1,68 ^c	10,14 \pm 1,26 ^d
RD	0,94 \pm 0,20 ^c	29,94 \pm 1,37 ^a	26,16 \pm 1,88 ^a	20,04 \pm 1,68 ^d	16,82 \pm 0,33 ^c
APROT	0,90 \pm 0,03 ^{c,d}	25,81 \pm 0,62 ^{c,d}	8,97 \pm 0,40 ^e	31,97 \pm 0,37 ^{a,b}	8,27 \pm 0,47 ^b

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância D.M.S. 5%

aumentaram a quantidade de C14:0 em todos os níveis sem diferença estatisticamente significativa, inclusive para o grupo APROT.

Observou-se, no presente estudo, que apesar da profunda diferença no perfil dos ácidos graxos ingeridos, o perfil no fígado manteve a mesma direção como ilustrado pela elevação da taxa de ácido palmítico (16:0) e do esteárico (18:0) em todos os tratamentos. Este efeito foi particularmente observado na elevação do ácido linoléico (18:2) nos grupos CASSA, uma vez que a gordura de coco utilizada na dieta consistia em só 3% de 18:2. Já os grupos CASIN, cujo óleo de soja utilizado para elaborar a dieta continha 53% de ácido linoléico, diminuiu o teor deste na gordura dos fígados dos animais experimentais. A quantidade de ácido oléico (18:1) sofreu uma pequena elevação no grupo que consumiu soja e um decréscimo acentuado para os consumidores de gordura de coco.

A diferença entre o efeito das duas dietas contendo alto teor de gordura foi na magnitude das mudanças dos níveis de ácidos graxos. O maior impacto da dieta CASIN-30/30 foi na quantidade de ácido linoléico (49%), muito semelhante à da gordura consumida (53%) e 82% maior do que a encontrada no CASSA-30/30 que ainda foi 62% mais elevada do que a quantidade consumida na dieta. Os grupos CASSA sempre apresentaram a menor concentração de ácido linoléico (C18:2) não apresentando diferença estatisticamente significativa entre seus níveis, mas diferindo de todos os outros grupos.

O comportamento do grupo RD mostrou-se semelhante ao dos grupos CASIN quando relacionados aos teores de ácido mirístico e oléico; também semelhante aos grupos CASSA quando comparado aos teores de ácido palmítico e diferente de todos os outros grupos mostrando a média mais

elevada na quantidade do ácido esteárico. Em relação ao ácido linoléico mostrou também diferença estatisticamente significativa de todos os outros tratamentos sendo maior do que os grupos CASSA e menor do que os grupos CASIN.

4.4. Histologia

Conforme já descrito em material e métodos, foram retiradas amostras de 3 lobos do fígado dos ratos no início do experimento (T0), no 15º dia (T1) e no 30º dia (T2) com a finalidade de realizar estudos em microscopia óptica (M0) e eletrônica (MET).

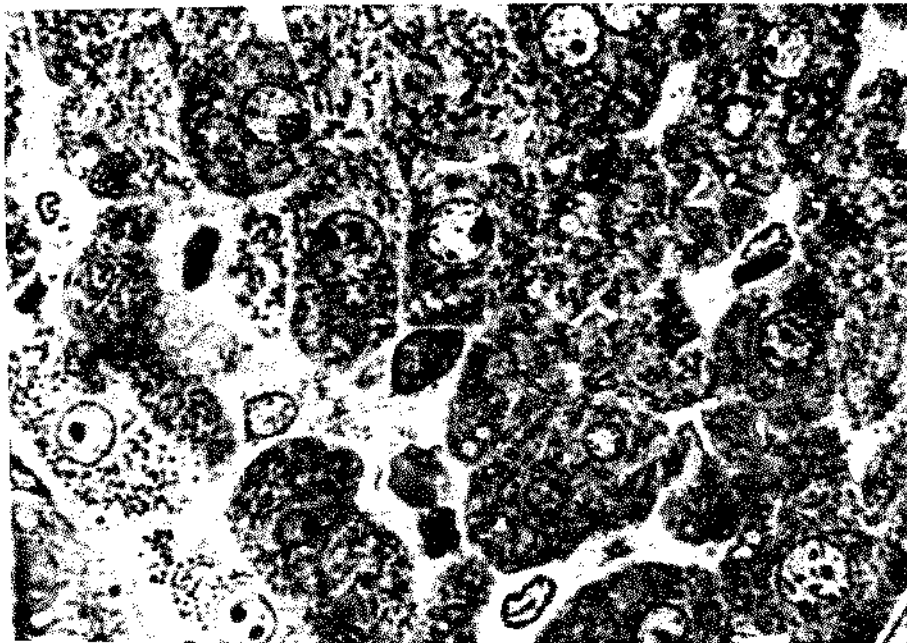


Figura 7 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato recém desmamado (RD), com 21 dias de idade. Azul Toluidina. 1200 X.

A microscopia óptica da Figura 7 demonstra células hepáticas normais de ratos recém desmamados de 21 dias. Observa-se aqui, a estrutura do

parênquima hepático onde os hepatócitos aparecem com núcleo de cromatina frouxo e nucléolos proeminentes. Neste campo não aparecem glóbulos de lipídios e os hepatócitos estão densos de mitocôndrias. Observam-se os núcleos dos hepatócitos ativos com a distribuição cromatínica característica.

Na Figura 8 em MET, estão presentes gotículas de lipídios (L) demonstrando que a gordura do leite materno (ao redor de 12%) é suficiente para se acumular nos hepatócitos em condições de normalidade. As mitocôndrias (M) são numerosas e distribuídas pelo citoplasma. O retículo endoplasmático rugoso (R), bastante desenvolvido nas imediações das mitocôndrias, indica franca atividade de síntese protéica. As mitocôndrias apresentam matriz densa e as cristas são de visualização impossível, o que é típico do fígado. A célula clara (I) é a célula Ito provavelmente ancorada por uma célula endotelial (E) do sinusóide hepático.



Figura 8 - Eletromicrografia do fígado de rato recém desmamado (RD), com 21 dias de idade; 7245 X

A Figura 9 (MO) demonstra que no fígado de rato consumindo dieta padrão (AIN-93) já aparecem numerosos glóbulos de gordura nos hepatócitos (→). A Figura 10 demonstra que dietas contendo gordura de coco (7%) acumula gotículas de lipídios em algumas células. As setas (↑) indicam citoplasma vacuolizado (parecendo hepatócitos necróticos) ao lado de hepatócitos inalterados (I).

A Figura 11 apresenta em MO fígado de rato sob dieta CASIN-30/30 após 15 dias de experimento. Os espaços sinusoidais (↑) estão amplos devido a perfusão efetuada, os hepatócitos estão normais.

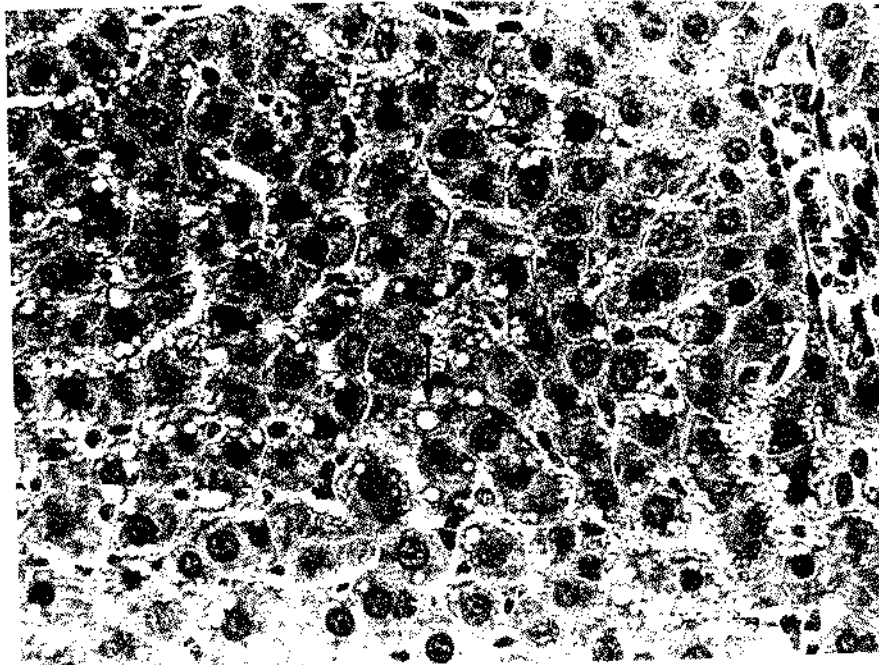


Figura 9 - Micrografia de secção histológica de fígado de rato, com 15 dias de ensaio, submetido à dieta CASIN-7/7 (padrão = AIN-93). Azul Toluidina. 480 X.

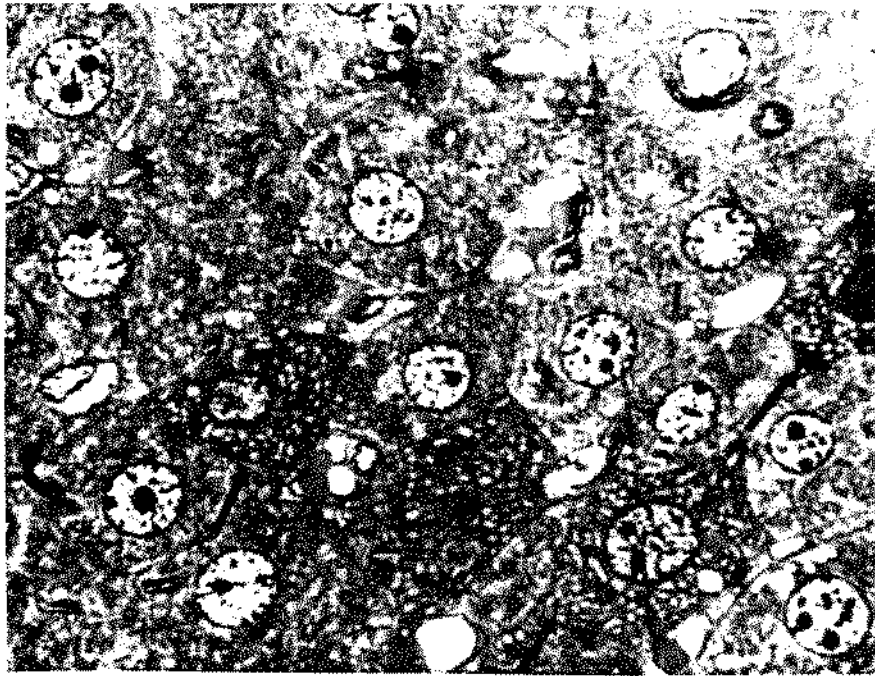


Figura 10 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato, com 15 dias de ensaio, submetido à dieta 7% de gordura de coco. Azul de Toluidina. 1280 X.

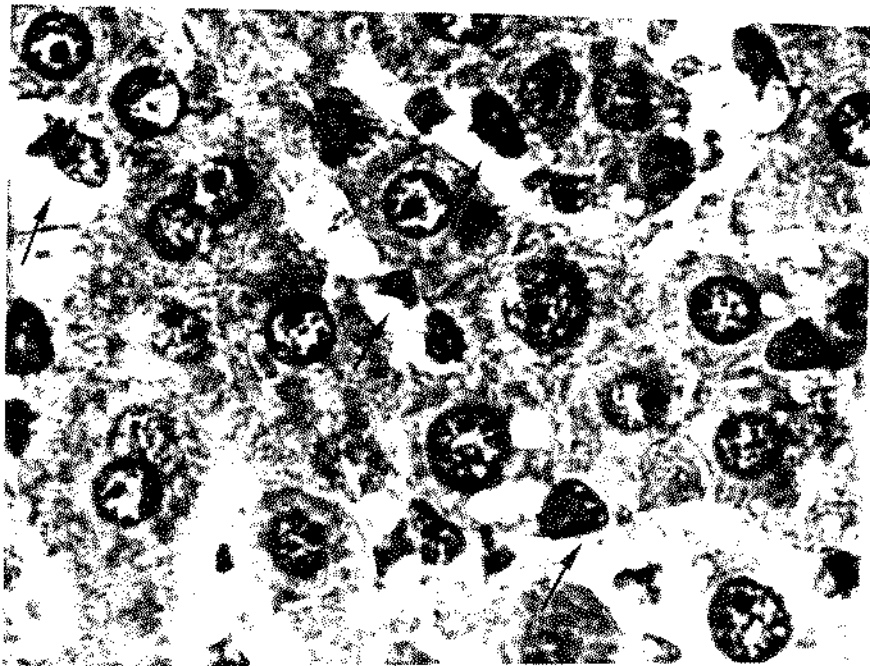


Figura 11. Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo dieta com CASIN- 30/30 por 15 dias, mostrando área de aparente normalidade. Azul Toluidina. 1376 X.

A figura 12 apresenta a mesma dieta (CASIN-30/30) em região onde observam-se inclusões lipídicas (L), mitocôndrias (M) com degenerações mielínicas e R.E.R. excessivamente demarcado em contraste às demais organelas.

A Figura 13 de CASIN-30/30, após 15 dias de experimento, apresenta predominância de área centrolobular íntegra (A). Mais distante e talvez mais relacionada com a área periportal aparecem áreas com gotículas de gordura (B) onde deve ter ocorrido lesão de hepatócitos

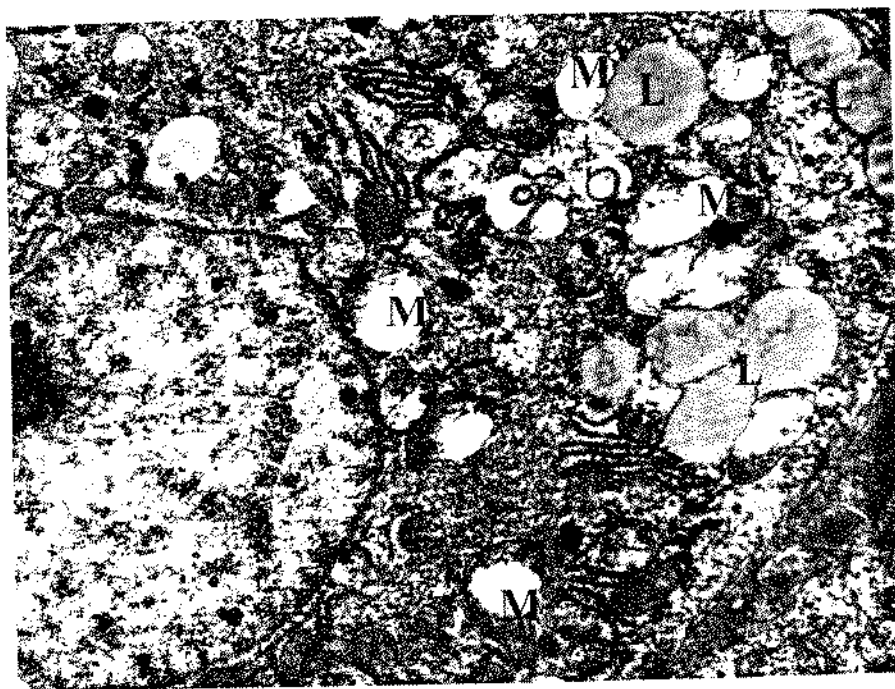


Figura 12 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de óleo de soja (CASIN-30/30) por 15 dias. 9200 X.

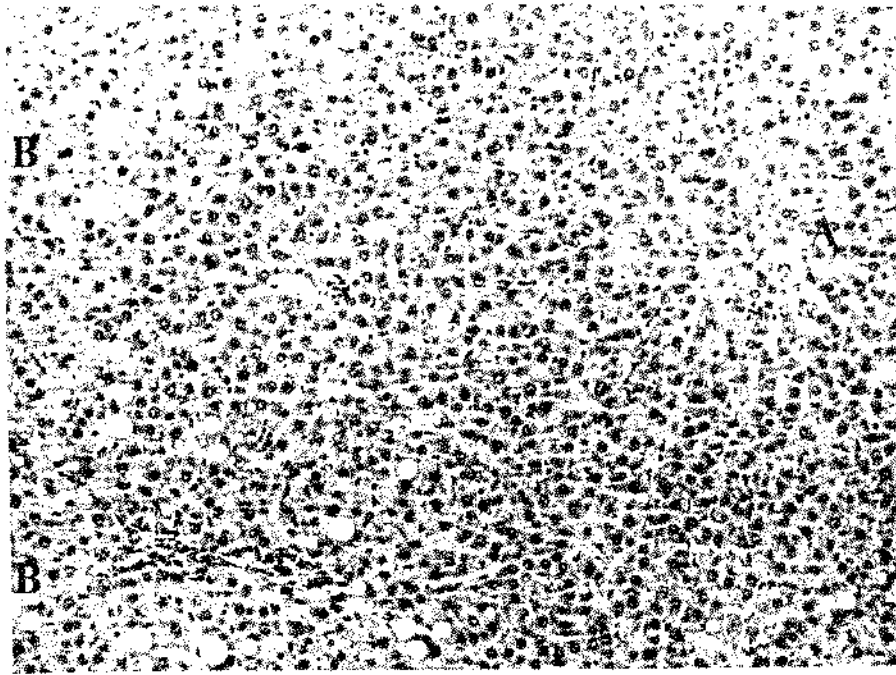


Figura 13 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo dieta com 30% de gordura de coco (CASSA-30/30) por 15 dias; 172 X.

A Figura 14 traz o detalhe de um hepatócito (CASSA-30/30 - 15 dias) onde, além da numerosa presença de peroxissomas (P), ocorre também a dilatação das cisternas do R.E.R. e sua vesiculação (R).

Nas Figuras 15, 16 e 17 encontram-se áreas aparentemente normais nos fígados dos ratos sob dieta CASIN-7/7 por 30 dias. O polimorfismo das mitocôndrias (M) é visível na Figura 15. Neste conjunto de figuras, as gotas de lipídios (L) são numerosas e a Figura 17 demonstra que não são envolvidas por membranas (↯). A área marcada com a letra G na Figura 16 indica provável presença de glicogênio.

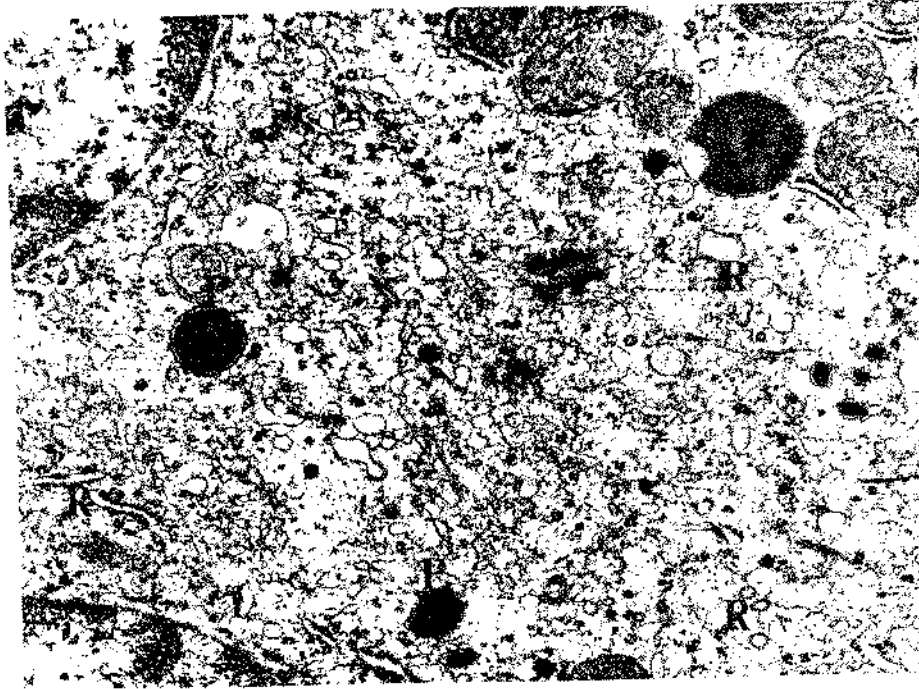


Figura 14 - Eletromicrografia do figado de rato consumindo dieta com 30% de gordura de coco (CASSA-30/30) por 15 dias. 23000 X

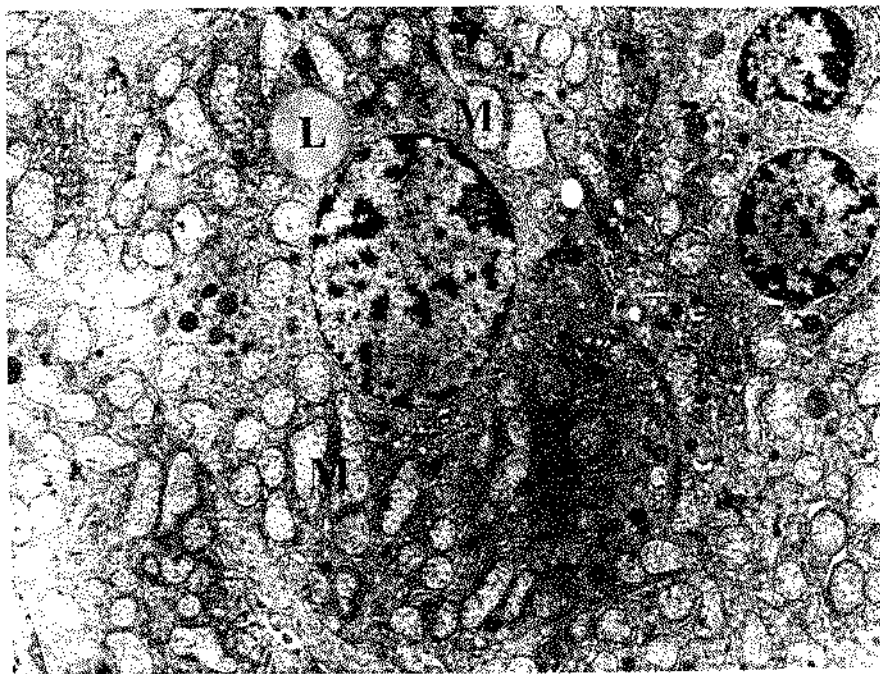


Figura 15 - Eletromicrografia do figado de rato consumindo dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias. 12600 X.

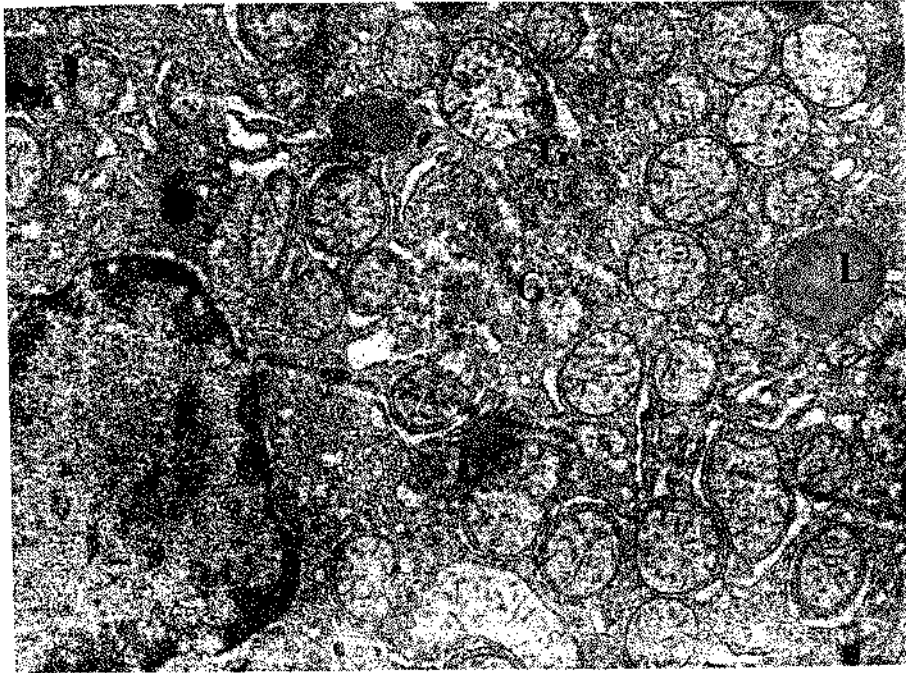


Figura 16- Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias. 14000 X.

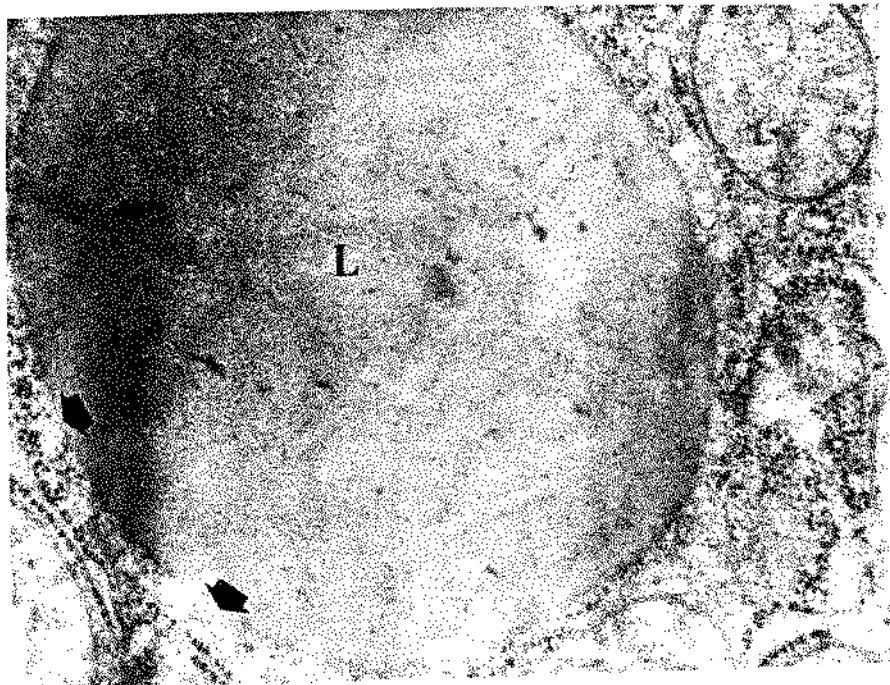


Figura 17 - Eletromicrografia de uma região do hepatócito de rato sob dieta com 7% de óleo de soja (CASIN-7/7) por 30 dias. 36000 X.

Após os primeiros 15 dias, quando os grupos que estavam recebendo 30% de gordura na dieta passaram a receber 5%, verificou-se modificações na morfologia dos hepatócitos. O corte histológico do fígado de rato (MO) consumindo agora 5% de óleo de soja na dieta demonstrou a regressão do número de gotículas de lipídios (Figura 18). O campo enfocado na MET da Figura 19 apresenta também aspectos de normalidade embora as mitocôndrias estejam pouco definidas.

A Figura 20 mostra o fígado de rato em dieta CASSA-30/5 após 30 dias de experimento, onde aparece uma região normal. Os glóbulos de lipídios ocupam pequena área das células (↑). Continuando nesta dieta a Figura 21 mostra quatro hepatócitos (↙) adjacentes ao sinusóide em aparente normalidade estrutural.

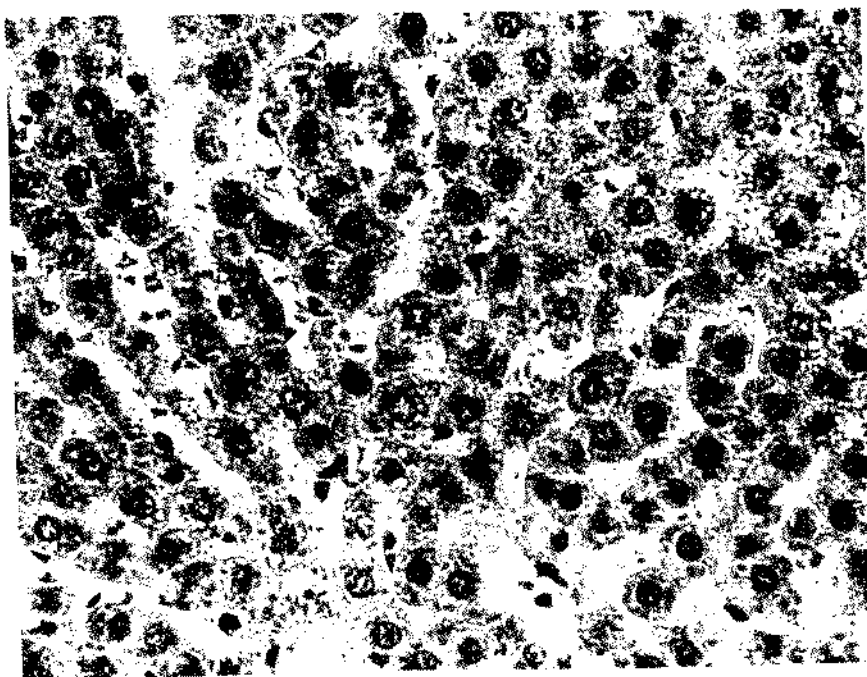


Figura 18 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato consumindo dieta com 5% de óleo de soja (CASIN-30/5), aos 30 dias do experimento. Azul Toluidina. 480 X.

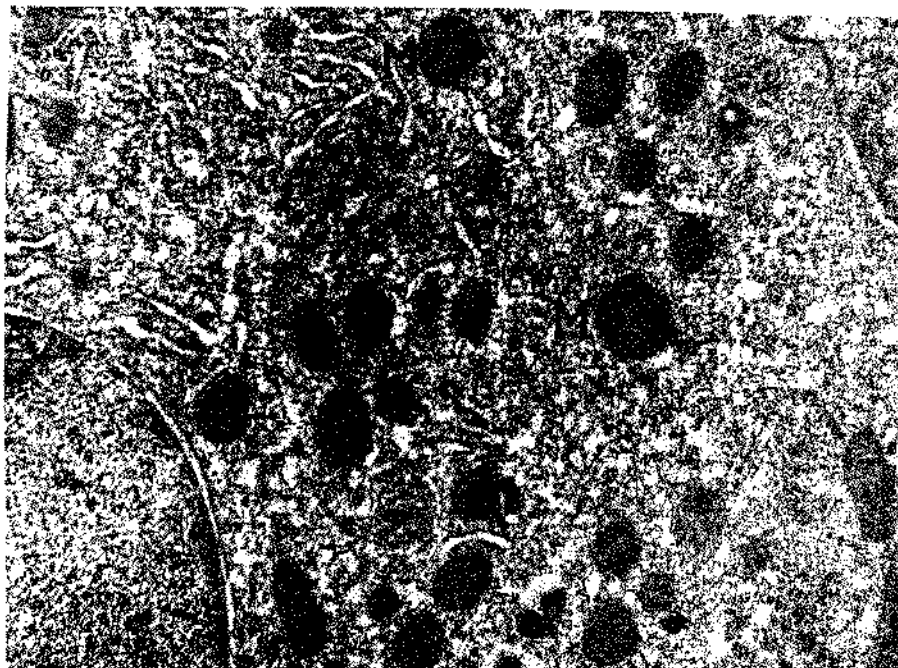


Figura 19 - Eletromicrografia do fígado de rato recuperado de uma dieta contendo 30% de óleo de soja, alimentado com a mesma dieta contendo 5% do óleo (CASIN-30/5). 17200 X.

Na Figura 22 é apresentado o hepatócito de rato alimentado por 30 dias com dieta CASSA-30/30. Nota-se que a matriz mitocondrial (M) está alterada e que o R.E.R. (R) exibe numerosas cisternas entre as mitocôndrias. Finalmente, a Figura 23 mostra o citoplasma de um hepatócito com numerosas gotas de lipídios, sempre desprovidas de envoltório. O interior das mitocôndrias (M) já está alterado mas o R.E.R. (R), neste campo, envolve as mitocôndrias em aparente normalidade.

Os fígados dos ratos da dieta CASIN-30/30 foram analisado e apresentaram, a exemplo do grupo CASSA-30/30, muitas áreas de tecido normal e outras com esteatose, sobretudo nas regiões periportais,

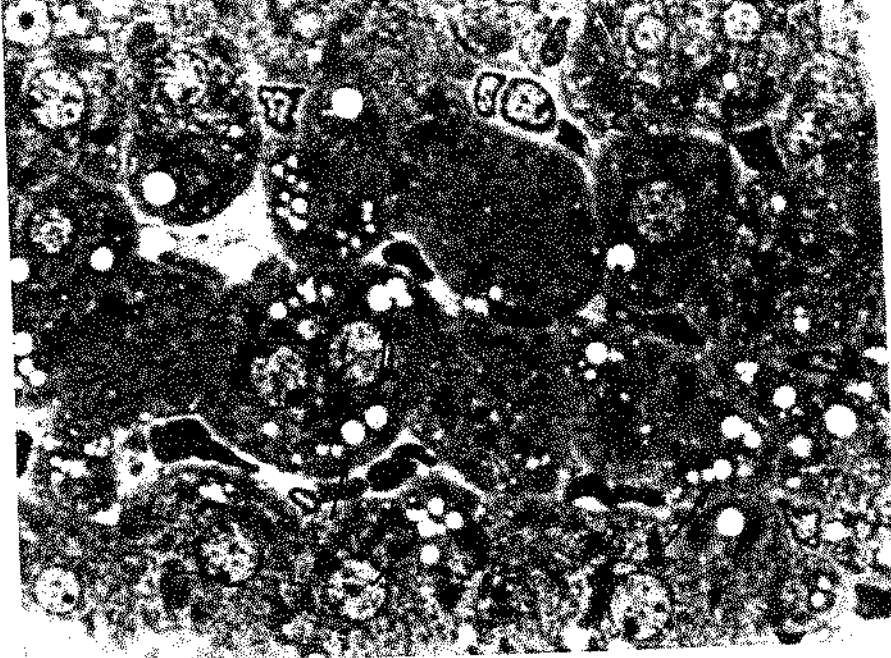


Figura 20 - Micrografia de secção histológica do fígado de rato recuperado de uma dieta com 30% de gordura de coco, consumindo a mesma dieta com 5% de gordura (CASSA- 30/5). 1280 X.

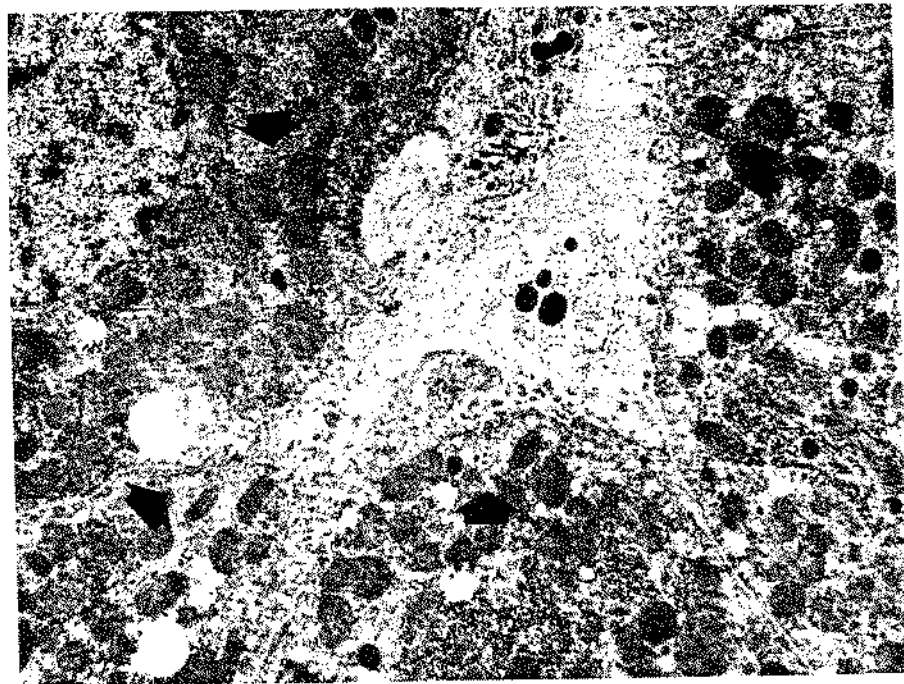


Figura 21 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 5% de gordura de coco (CASSA-30/5). 5075 X.



Figura 22 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de óleo de soja (CASIN-30/30) por 30 dias. 12600 X.

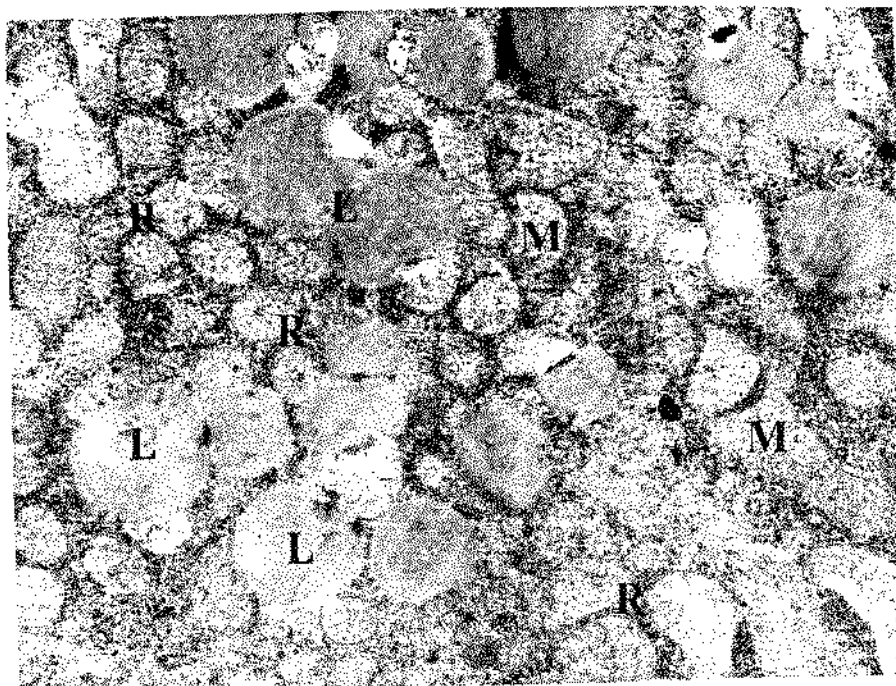


Figura 23 - Eletromicrografia do fígado de rato consumindo dieta com 30% de gordura de coco (CASSA-30/30) por 30 dias. 12600 X.

A Figura 24 apresenta em MO a aparência esponjosa típica dos hepatócitos de animais em dieta aprotéica; a vacuolização na realidade

A Figura 24 apresenta em MO a aparência esponjosa típica dos hepatócitos de animais em dieta aprotéica; a vacuolização na realidade contém glóbulos de gordura e mitocôndrias denaturadas. Ao comparar-se com as Figuras 7 e 10 nota-se que na presente Figura os núcleos estão picnóticos (➤).

Em MET, na Figura 25, reforça-se o aspecto degenerativo dos hepatócitos: observam-se os mesmos fenômenos encontrados nas alterações causadas por dietas hiperlipídicas; há perda das cristas mitocondriais (M) e gradativo esvaziamento com formação de figuras mielínicas. Finalmente, na Figura 26 nota-se a permanência do R.E.R. (R) e várias mitocôndrias em estágios subseqüentes de degeneração (D) da matriz, demonstrando que o quadro de alteração dos hepatócitos segue a mesma evolução obtida nos animais sob dietas hiperlipídicas.

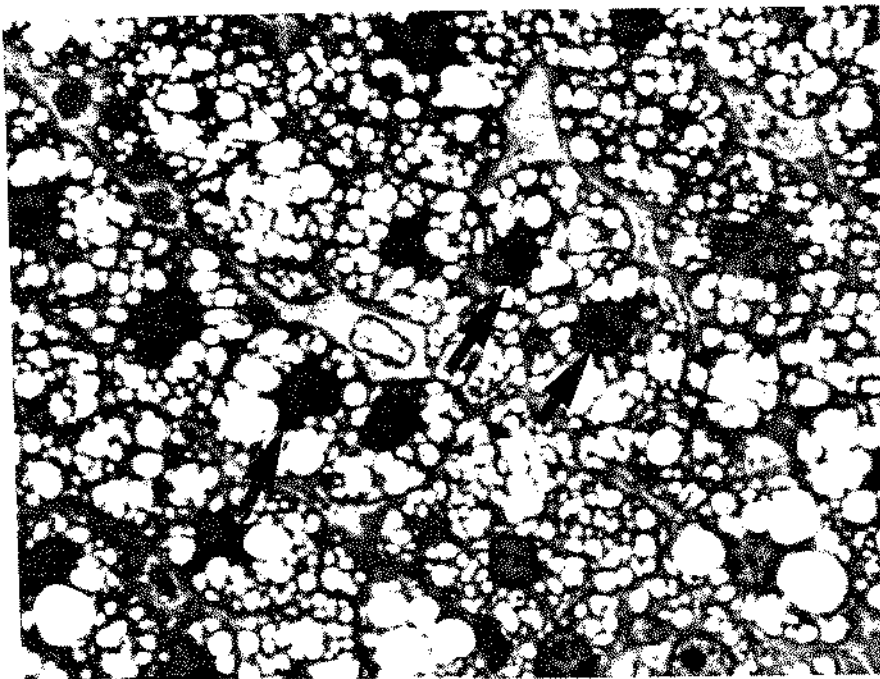


Figura 24 - Micrografia de secção histológica do fígado de ratos com dieta aprotéica (APROT). Azul Toluidina. 512 X.

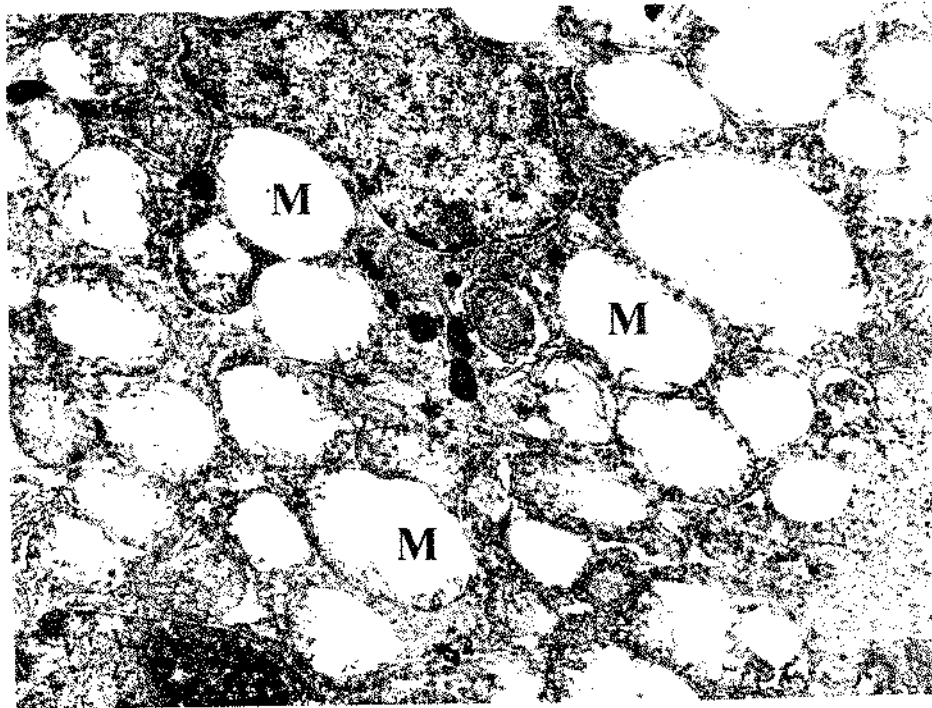


Figura 25 - Eletromicrografia do fígado de rato alimentado com dieta aprotéica (APROT). 9200 X



Figura 26 - Detalhe em eletromicrografia do citoplasma de um fígado de rato sob dieta aprotéica (APROT). 46000 X.

Os resultados histológicos estão apresentados abaixo de forma abrangente e sistematizada:

- Os fígados dos ratos RD apresentaram reservas lipídicas sob a forma de gotículas esparsas no citoplasma por ocasião do desmame.
- Nas dietas semi-purificadas, pós desmame e até o encerramento dos ensaios, verificou-se gradativo acúmulo de lipídios nos hepatócitos.
- Os acúmulos de lipídios preferenciaram as áreas periportais e o espaço ocupado dependeu da quantidade de gordura oferecida na dieta.
- Não foi possível precisar se a esteatose ocorrida com dieta CASSA-30/30 foi mais profusa do que a esteatose com dieta CASIN-30/30.
- Os cortes histológicos demonstraram extensas áreas de tecido normal o que explica os índices bioquímicos do tecido hepático obtidos (Tabelas 20, 21 e 22).
- A primeira organela a ser atingida na degeneração por esteatose foi a mitocôndria, seguida pela vacuolização do R.E.R. O Aparelho de Golgi e o glicogênio foram pouco visíveis devido ao jejum prévio dos animais.
- No grupo dos animais aprotéicos a alteração hepática, ou seja a esteatose, foi muito intensa e difusa e, do ponto de vista citológico, não se distinguiu dos pontos focais de esteatose ocorrida nos ensaios com dietas semi-purificadas com 7 % ou 30 % de lipídios.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação Nutricional

Este trabalho teve como finalidade estudar alguns aspectos metabólicos conseqüentes à administração de dietas hiperlipídicas em ratos pós-desmame. As dietas foram do tipo semi-purificadas e designadas na literatura por AIN-93. Estas dietas se caracterizaram pela presença de 20% de caseína, cujo desempenho é ideal para o pleno crescimento do rato (REEVES et al., 1993).

Os tratamentos utilizados no presente experimento consistiram em seis dietas formuladas de acordo com as recomendações AIN-93 (loc cit), exceto para lipídios. O óleo de soja ou a gordura de coco estavam em três níveis diferentes (7%, 30% e 5%) e forneciam ao redor de 15%, 50% e 11% da energia total da dieta. Dos lipídios usados, a gordura de coco forneceu 56 % de ácidos graxos de cadeia média dos quais 82% eram saturados. O óleo de soja forneceu 98 % de ácidos graxos de cadeia longa dos quais 16% eram saturados. O ácido linoléico perfazia 53 % do óleo de soja e 3 % da gordura de coco.

5.1.1. Avaliação ponderal dos animais

A quantidade de gordura utilizada na dieta influenciou no ganho de peso, na deposição de gordura corporal e foi fator determinante do consumo

de alimento. O ganho de peso e a massa de tecido adiposo aumentam menos nos animais alimentados com dietas contendo TCM do que nos animais alimentados com dietas isocalóricas contendo TCL, o que está de acordo com os resultados de GELIEBTER et al (1983) e LAVAU & HASHIM (1987). Estes resultados também foram confirmados, em 1987, por HASHIM & TANTIBHEDYANGKUL que, trabalhando com TCM na alimentação de ratos pós-desmame, concluíram que o uso de TCM na dieta diminuiu o tecido adiposo quando comparado ao TCL e que isto ocorreu devido às grandes diferenças no modo de digestão, absorção e metabolismo dos dois triacilgliceróis. Para LYNCH & BAILEY (1995) a oxidação que ocorre nas mitocôndrias hepáticas após a absorção e a lipogênese que ocorre no citosol deve resultar em gasto energético e finalmente menor massa adiposa nos tecidos de estoque.

Os mesmos autores estudando os efeitos dos triacilgliceróis no ganho de peso de ratos, concluíram que a energia da dieta cedida pelos TCM resultou em menor ganho com menor deposição de gordura e menor diâmetro dos hepatócitos, demonstrando o efeito da composição dos TAG da dieta na regulação do peso.

No presente trabalho, os resultados mostraram que houve discreta interferência no ganho de peso dos ratos Wistar com alimentação *ad libitum* por 30 dias quando se alterou o tipo e o nível de lipídios das dietas. O ganho de peso no período foi semelhante embora sempre menor para os grupos CASSA chegando a ser significativa para o grupo recuperado de 30% de gordura de coco, CASSA-30/5 (Tabela 7). Entretanto na histologia, dos fígados dos animais que consumiram 30 % de gordura na dieta, observaram-se alterações morfológicas com infiltração de lipídios, principalmente

periportal, sendo mais intensas para os grupos que receberam óleo de soja (Figuras 12,13 e 14).

Para CHANEZ et al. (1991), que trabalharam com ratos em crescimento, o consumo alimentar durante 45 dias não foi alterado pela presença de triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) ou triacilgliceróis de cadeia média (TCM) nas dietas. Entretanto os animais que consumiram TCL apresentaram maior peso. É necessário destacar que no presente experimento o consumo diminuiu de forma significativa quando a gordura da dieta foi elevada para 30% e também quando a gordura foi reduzida para 5 %, independente do tipo de lipídio utilizado.

Outro fato importante foi a semelhança de peso corpóreo dentro dos grupos com os mesmos níveis de óleo de soja ou gordura de coco. Esta semelhança foi encontrada também por SATCHITHANANDAM et al. (1993) que, ao trabalhar com gordura de coco e óleo de gergelim em níveis de 12% e 24%, encontraram menor ganho de peso para os grupos que consumiram gordura de coco; menor peso também ocorreu nos grupos que consumiram dietas contendo 24% de gordura de coco ou de óleo de gergelim.

5.1.2. Avaliações de PERop, CEA e NPR

A razão da eficiência protéica (PER) é usada como indicador sensível da qualidade da proteína. Em 1946, MITCHELL já avaliava a eficiência protéica por método biológico. Num encontro da A.O.A.C., em 1958, um grupo de pesquisadores discutiu a importância do método de avaliação protéica e a possibilidade de desenvolver uma técnica padrão levando em conta as variações experimentais tais como sexo, idade do animal, tipo de hidrato de carbono usado na dieta, tempo do período experimental, nível e tipo de proteína (animal ou vegetal) e técnica de alimentação (DERSE, 1960).

As dietas (isoprotéicas) deste experimento foram elaboradas utilizando, 17% de proteína proveniente de caseína comercial; portanto para efeito de cálculo os índices obtidos devem ser considerados como valores operacionais.

LING et al. (1986), trabalhando com a avaliação da qualidade da proteína em dietas contendo triacilgliceróis de cadeia média e triacilgliceróis de cadeia longa concluíram que usando TCM houve redução do depósito de gordura sem afetar o conteúdo total de proteína do corpo e que o PER pode não ser um indicador útil para avaliar a qualidade da proteína da dieta quando a fonte de gordura é TCM.

Então neste experimento foram calculados outros índices como o NPU, representado como a fração do nitrogênio retido da ingesta; o crescimento, representado pela diferença de ganho de peso entre o início e o final do experimento e o CEA, representado pela relação entre ganho de peso e consumo de dieta. No entanto as respostas a estes índices seguiram a mesma tendência demonstrando que, com estes tipos e níveis de gordura, o PERop apresentou resposta compatível com os outros índices calculados, o que ficou evidenciado pela correlação positiva entre PERop e NPR (0,9830) e entre PERop e CEA (0,9901).

O CEA, PERop e NPR mostraram respostas similares com diferença significativa para os grupos que consumiram maior quantidade de lipídios, indicando que houve menor consumo e melhor resposta metabólica dos animais quando foi colocado 30% de óleo de soja ou de gordura de coco na dieta AIN-93 (Tabela 8).

5.1.3. Avaliação de Dv, VBv e NPUv

A digestibilidade, o valor biológico e a utilização líquida da proteína não foram afetados pelo tipo ou pelo nível de gordura consumida na dieta. É muito interessante realçar que a digestibilidade da gordura foi excelente (média de 97 %) demonstrando que as gorduras das dietas não foram perdidas via fecal e, portanto, alcançaram equilíbrio plasmático e de reserva tissular. SCHRIJVER et al. (1992), demonstraram também que a capacidade metabólica de lipídios dos ratos foi alta porque exprimiram estados de equilíbrio a nível plasmático mesmo quando alimentados com composição distintas de ácidos graxos.

5.1.4. Estimativa do valor energético das dietas

O valor energético (energia bruta = EB) é determinado por combustão completa em bomba calorimétrica adiabática ou calculado através da composição centesimal da dieta. A energia digerível (ED) leva em conta as perdas fecais e a energia metabolizável (EM) as perdas fecais e urinárias.

Normalmente para a determinação de energia utilizam-se machos adultos para os quais se espera equilíbrio nitrogenado (MUZTAR & SLINGER, 1981). No presente experimento a determinação de energia foi feita com ratos entre o 21° e 36° dia de vida, em fase de crescimento intenso e, portanto, presumivelmente em balanço de nitrogênio positivo.

Os animais experimentais de todos os grupos deste trabalho apresentaram balanço nitrogenado positivo com média de retenção de 3,05 g para os grupos que receberam 7% de gordura na dieta e de 2,25/2,45 g para os animais que consumiram 30% de óleo de soja e gordura de coco. Estas médias de retenção de N obtidas nos balanços demonstraram correlação

negativa moderada com o consumo de lipídio da dieta (-0,6125). Não houve diferença nas médias de retenção nitrogenada entre os grupos consumindo alta concentração de gordura na dieta independente do tipo de lipídio usado. Mas comparando os níveis lipídicos baixos (7%) com níveis de lipídios altos (30 %) verificou-se diferença estatisticamente significativa a favor dos grupos de animais que consumiram menor quantidade de lipídios. A diferença observada na retenção de nitrogênio não foi, entretanto, suficiente para afetar a utilização de energia, determinada por EDa ou o valor biológico da proteína medido através da Dv, VBv e NPUv.

Do total de 431,4 kcal/100g na dieta controle (AIN-93) 63% foi fornecida pelos carboidratos, 22% pelas proteínas e 15% pelos lipídios. Quando os lipídios das dietas foram aumentados de 7% para 30%, os hidratos de carbono diminuíram sua participação de 63 % para 32% de energia e participação total na dieta subiu para 552,10 kcal/100g (Tabela 10).

É de conhecimento corrente (CLARCKE et al., 1977a, EDWARDS & DEAN, 1985) que o consumo de uma dieta alta em energia é menor em relação a outra de baixa energia e, portanto, o menor consumo diminuirá o aporte dos demais nutrientes. No entanto, neste experimento, a redução do consumo de dieta não foi suficiente para afetar o ganho de peso e sequer o aspecto saudável dos animais. O grupo que ganhou menor peso $152,87 \pm 9,90$ g (CASSA-30/5) teve consumo superior ($382,72 \pm 18,42$ g) ao grupo CASIN-30/30 que consumiu a menor quantidade ($353,03 \pm 21,04$ g) de dieta e ganhou o maior peso ($174,22 \pm 9,83$ g). No presente trabalho o nível de energia atuou sobre o consumo alimentar que sofreu redução significativa quando avaliado após 15 dias e 30 dias de experimento. Finalmente, pode-se demonstrar que o aporte lipídico não atingiu valores inadequados do ponto de vista energético

porque a correlação entre consumo e absorção de lipídios foi praticamente absoluta (0,9999).

5.2. Perfil bioquímico do sangue

5.2.1. Análise dos lipídios séricos

O tipo e a quantidade de lipídios usados na dieta (NORUM, 1992), de proteína (HORIGOME & CHO, 1992, ALJAWAD et al., 1991) e de colesterol livre (SÉROUGNE et al, 1995) estão relacionados à concentração de lipídios do soro sanguíneo. GARG et al., (1989) concluíram que os TCM contribuem para o aumento na concentração do colesterol sérico e NORUN (1992) e WALL et al, (1994) observaram que o TCL diminui esta concentração de colesterol. No presente experimento só foi alterado o tipo e quantidade de gordura mantendo os outros fatores constantes para que as mudanças ocorridas nos lipídios séricos pudessem seguramente ser atribuídas ao tipo e/ou à quantidade de gordura utilizados.

As conseqüências metabólicas do consumo de altas concentrações de gordura na dieta dependem em parte do tipo de lipídio ingerido. O grau de saturação da gordura altera a função das enzimas da membrana celular, a resposta do receptor mediato e a atividade das enzimas lipogênicas. (HERZBERG, 1983). Em 1990, SHILLABEER et al., trabalhando com as enzimas lipogênicas: ácido graxo sintetase (complexo de enzimas envolvidas na síntese *de novo* dos ácidos graxos de cadeia longa) e glicerofosfato desidrogenase (chave intermediária entre o caminho glicolítico e a síntese de TAG) concluíram que, quando ratos consomem *ad libitum* alta concentração de gordura saturada na dieta, apresentam significativo decréscimo do complexo enzimático ácido graxo sintetase comparado com o grupo pareado

que consumiu dieta com amido. Mas quando o consumo calórico de duas dietas com alta concentração de gordura saturada e insaturada é igual, o nível do complexo enzimático ácido graxo sintetase é mais elevado nos ratos alimentados com ácidos graxos saturados. Quando as calorias e o consumo total de gordura são constantes a dieta induz a síntese endógena de TAG promovendo aumento no depósito de gordura corporal.

No atual experimento os resultados, relacionados com os TAG do soro (Tabela 14), mostraram maiores médias em T1 (15^o dia) e em T2 (30^o dia) para os grupos que consumiram maior quantidade de gordura de coco na dieta. Este fato pode ser explicado pelas conclusões, dos autores acima citados, de que altas concentrações de ácidos graxos saturados na dieta inibem, embora com menor eficiência, a lipogênese do que os ácidos graxos insaturados. Também ficou evidenciado que o tempo é fator agravante de aumento no nível dos triacilgliceróis sanguíneos uma vez que em todos os tratamentos houve elevação de T1 para T2.

SATCHITHANANDAM et al. (1993) concluíram que há redução na absorção de colesterol e de ácido oléico na linfa de ratos Wistar alimentados com óleo de gergelim em comparação aos alimentados com gordura de coco.

OTTO et al. (1992) encontraram redução nos níveis de TAG e colesterol do plasma sanguíneo em ratos alimentados com gordura de suíno e óleo de peixe com baixa concentração (11,5%) e média concentração (20,8%) de energia oriunda de lipídios na dieta. A baixa concentração de gordura e a média concentração de óleo de peixe causaram aumento no nível de glicose plasmática sem mudança significativa na concentração de insulina indicando que a redução dos ácidos graxos livres pelo óleo de soja não foram relacionados com a concentração de insulina ou com sua sensibilidade. O estudo destes autores explica que a aparente variação de resposta ao nível

plasmático de ácidos graxos livres ocorre devido ao estado nutricional do animal no momento da coleta das amostras do sangue. No presente experimento os trabalhos iniciaram-se sempre no mesmo horário (7:00 h) e com os ratos nas mesmas condições de jejum de 16 horas, com o intuito de eliminar este fator de variação.

O colesterol sérico é um complexo balanço entre o consumo, a absorção e a síntese endócrina por um lado e a utilização e catabolismo por outro. WONG et al. (1995) observaram que indivíduos hipercolesterolêmicos obtiveram redução do colesterol plasmático quando a proteína animal da dieta foi substituída por proteína de soja. No atual experimento eliminou-se estas oscilações ou utilizar-se apenas a fonte protéica da caseína.

Focalizando a presença do colesterol no soro sangüíneo de ratos (Tabela 15), vê-se que no espaço de tempo estudado, recém-desmamado ao 56° dia, o valor de colesterol oscilou entre 60 a 75 mg/dL aproximadamente, e dentro desta oscilação quando aumentava a quantidade no sangue decrescia nos hepatócitos e vice versa (Tabela 22). Assim, tudo indica que o rato Wistar está dentro das características das linhagens mais correntes, isto é, sua capacidade de produção e modulação hepática é muito alta (SUCKLING & JACKSON, 1993). Por conseqüência a quantidade de óleo de soja ou gordura de coco não atingiu níveis que pudessem descompensar a citada capacidade. Atualmente para estudos de hipercolesterolemia em ratos e suas reações a medicamentos hipercolesterolemiantes empregam-se linhagens mutantes especiais (loc cit).

5.2.2. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica intracelular que age sobre os fosfoglicerídios ou ésteres fosfóricos, completando sua degradação com a

liberação de fósforo. Alterações na atividade da fosfatase alcalina do soro sanguíneo pode indicar, pelo menos em parte, incapacidade de excreção biliar ou lesão das células hepáticas (SHERLOCK, 1985). Estando elevada no soro sanguíneo, indica aumento de atividade nos osteoblastos onde encontra-se em maior concentração. Deve-se entretanto verificar a idade dos animais pois o aumento fisiológico de atividade desta enzima ocorre no soro de ratos em crescimento. Valores normais de atividade da fosfatase alcalina, demonstrados por RINGLER & DABICH (1979), oscilam entre o máximo de 480 U/L, para ratos machos com 8 semanas de idade a 220 U/L para animais do mesmo sexo com 7 meses.

Os valores encontrados neste trabalho (Tabela 17) são mais elevados para T0 e T1, decrescem um pouco em T2 sendo compatíveis com a literatura citada. Deve-se observar que em T0 e T1 os ratos estavam em fase intensa de crescimento e em T2 entrando na oitava semana de vida. Os resultados obtidos não se relacionam com o aumento de lipídios nas dietas e também não apontam para prejuízo hepático porque no decorrer do período experimental a atividade da fosfatase alcalina apenas decresceu dentro da normalidade proposta por RINGLER & DABICH (1979).

5.2.3. Glicose e proteínas totais

O nível de glicose plasmática neste experimento manteve-se dentro da faixa de normalidade (BAKER et al., 1979), que varia de $98 \pm 8,5$ a $161 \pm 22,3$ mg/dL para ratos em jejum, indicando que os animais experimentais utilizaram as reservas de glicogênio hepático para manter o nível sérico pois ficaram em jejum por 16 horas. Este fato ficou evidenciado nas micrografias obtidas em MET, pois os depósitos de glicogênio ficaram muito reduzidos após o jejum

imposto pelo manejo efetuado antes da coleta de sangue dos animais (Figura 16).

Quanto às proteínas totais (PT) encontradas no soro sangüíneo dos ratos, os resultados do presente trabalho evidenciaram um pequeno aumento da concentração das proteínas a partir do desmame ao 56° dia de experimento. É interessante destacar que mesmo após 15 dias de dieta aprotéica os ratos apresentaram em média 3,48 g/dL de PT, enquanto na mesma data, a média das quatro dietas experimentais foi de 5,22 g/dL. Estas considerações levam a concluir que as proteínas totais não são valores indicativos em ensaios de metabolismo lipídico.

5.3. Perfil bioquímico do fígado

A Tabela 19 demonstra de forma inequívoca que os fígados dos ratos, independentemente das dietas ou dos tempos, mantiveram uma relação PF/PC semelhante. Este fato seria inesperado porque os lipídios totais hepáticos estavam 48 % mais elevados nos animais alimentados com a dieta CASIN-30/30 e 43 % nos alimentados com CASSA-30/30 em relação aos respectivos grupos com 7 % de gordura. Um discreto aumento de peso do fígado apareceu no grupo APROT que também apresentou a maior concentração de lipídios totais e de TAG confirmando a extensa esteatose observadas nos cortes histológicos em MO (Figura 24) e nas observações ultraestruturais em MET (Figuras 25 e 26).

5.3.1. Lipídios hepáticos

A Tabela 20 mostra que as dietas contendo gordura de coco retiveram menor taxa de lipídios no fígado do que as dietas com óleo de soja. Estes

resultados, aliados ao comportamento dos TAG (Tabela 21), evidenciaram que o uso, por 30 dias, de 30% de gordura na dieta de ratos provoca elevação acentuada de TAG. É preciso, no entanto, lembrar que não foi comprometido o ganho de peso (Tabela 7) e sequer o aspecto saudável dos animais.

Determinando-se a correlação existente entre os lipídios totais e TAG dos fígados obteve-se uma correlação positiva e elevada (0,8350). A menor quantidade de lipídios totais e TAG, encontrada nos fígados dos animais que consumiram TCM nas dietas, é explicada pelo modo de absorção, transporte e oxidação hepática dos ácidos graxos de cadeia média (BABAYAN, 1987). CHANEZ et al. (1991) ao se ocuparem dos efeitos metabólicos dos TCM nas dietas de ratos enfatizaram também que os TCM são rapidamente digeridos, absorvidos e transportados ao fígado como ácidos graxos livres onde são extensivamente oxidados. Pelo fato de acumularem menor quantidade de tecido adiposo em relação aos ratos em dietas com TCL, estes autores propuseram que a energia obtida dos TCM teria sido empregada em termogênese.

MONSMA & NEY (1993) utilizando óleo de milho, gordura de suíno, gordura bovina e manteiga de cacau na alimentação de ratos e MLEKUSCH et al. (1993) trabalhando por 20 semanas com 30 % de TCM e TCL nas dietas experimentais e 2% na dieta controle, encontraram resultados semelhantes para o peso dos fígados em relação ao peso corporal e para percentagem de lipídios totais. Entretanto ocorreram diferenças significantes para os TAG e colesterol total hepático. Estes e outros resultados obtidos levaram os autores a concluir que a alta concentração de ácidos graxos insaturados na dieta pode alterar o perfil dos lipídios hepáticos de ratos com maior intensidade do que os ácidos graxos saturados quando usados na mesma concentração.

Sabe-se, desde 1967 (TAYLOR et al.), que no fígado de ratos em desenvolvimento ocorrem mudanças na taxa de conversão de carboidrato a lipídios: a lipogênese decresce após o nascimento, aumenta intensamente após o 20º dia e estabelece um declínio constante do 35º dia até a maturidade. O decréscimo da lipogênese, após o nascimento, coincide com o período de aleitamento; a elevação ocorre com o desmame de modo que a influência dos fatores nutricionais são tão atuantes quanto os genéticos.

Os autores supra citados esclarecem que no início da vida o rato passa por duas mudanças bem caracterizadas na área nutricional: a primeira é repentina quando há troca da alimentação transplacentária, onde predomina hidrato de carbono, pelo leite materno, com maior teor de gordura. A outra, mais gradual, será quando o aleitamento materno for substituído pela dieta sólida que pode ser elaborada dentro de um amplo limite de fórmulas, consideradas normais.

A informação acima foi confirmada ponto a ponto, neste experimento, pelos resultados obtidos com os animais controles CASIN-7/7. A primeira coleta de fígado (T0) foi feita no 21º dia de idade e, segundo TAYLOR et al. (1967) os animais estavam no início da fase do aumento da lipogênese e demonstraram $4,57 \pm 0,29$ % de lipídios totais hepáticos como patamar. Na segunda coleta (T1), no 15º dia, que corresponde ao início da fase de declínio de lipogênese, obteve-se média de $7,56 \pm 0,79$ %. Na terceira coleta (T2), os ratos com 54 dias de vida apresentaram média de $6,14 \pm 0,51$ %. Com respeito às dietas hiperlipídicas, podemos ver através das Tabelas 13 e 20, que a retenção de lipídios das dietas testes pelo fígado, sobrepõem-se ao valor do grupo controle.

Para LOCKWOOD et al. (1970), das enzimas associadas à lipogênese, a málica tem um papel importante na conversão hepática de carboidratos em

lipídios e sofre aumento imediato em respostas a mudanças na dieta. Esta enzima converte piruvato em malato que, após transporte para dentro da mitocôndria, pode ser convertido em oxalacetato pela malato desidrogenase. No desmame, com a mudança para alta concentração de hidrato de carbono na dieta a taxa glicolítica pode ser aumentada e à proporção que forma piruvato ele pode ser direcionado para a síntese de ácidos graxos.

Existe uma relação direta entre o teor de gordura ingerido e a diminuição da lipogênese. HERZBERG (1983) relatou que nas formulações experimentais é comum substituir o hidrato de carbono por lipídio nas dietas com altas concentrações de gordura ficando a dúvida se esta inibição foi devido à inclusão da gordura ou à redução de carboidratos ou a ambos.

Entretanto em 1978, TRISCARI et al. demonstraram que o efeito inibidor era devido ao teor de lipídio consumido na dieta, evidenciando que quando o rato consome dieta com 20% de lipídio ele ainda ingere suficiente hidrato de carbono para manter a taxa de lipogênese idêntica ao do rato consumindo dieta sem lipídio. Então a inibição da lipogênese seria devido ao aporte específico de lipídio e não causada pela redução de aporte de carboidrato.

Em pesquisas recentes, SHILLABEER et al. (1990) concluíram que a atividade do complexo enzimático ácido graxo sintetase diminuiu quando compararam ingesta de alta concentração de ácido graxo saturado com amido na dieta, mas quando comparada com ácido graxo insaturado obtiveram nível mais elevado de atividade desta enzima. Dietas com altas concentrações de ácidos graxos saturados ou insaturados e de amido induzem de maneira similar aumento na atividade da glicerofosfato desidrogenase no fígado.

Para OTTO et al. (1992), que trabalharam com óleo de peixe, o acúmulo de TAG hepático só foi observado nos animais que consumiram alta

concentração de gordura (30% da energia) na dieta sugerindo uma aparente inibição direta da excreção dos triacilgliceróis.

No presente estudo foi demonstrado que os padrões de comportamento lipídico do fígado (Tabelas de 20 a 22) seguiram o esperado, inclusive aumentando a concentração em T2 nos grupos que receberam alta concentração de lipídios na dieta (CASIN-30/30 e CASSA-30/30).

O consumo de dietas contendo gordura saturada, com ou sem colesterol, quando comparada ao consumo de gordura insaturada, aumenta significativamente a concentração de colesterol LDL e HDL (BEYNEN et al. 1984, HORIZOME & CHO, 1992; NORUM, 1992; OTTO et al., 1992; ABBEY et al., 1994;). Entretanto RUBIN et al. (1992), trabalhando com infusão de TCM e TCL em ratos alimentados com dietas livres de gordura, observaram mudanças morfológicas e aumento do conteúdo de colesterol hepático só para os grupos que receberam TCL. Os autores relataram que a elevação do nível de colesterol do fígado originou-se do aumento da mobilização do colesterol extra-hepático para o fígado. Também, MLEKUSCH et al. (1993), usando dietas com 63 % de energia derivada de lipídios, encontraram aumento no nível de colesterol total sérico e do fígado nos animais que consumiam dieta com gordura insaturada quando comparou-os com os ratos que consumiram gordura saturada.

As respostas encontradas no presente experimento foram similares às encontradas por RUBIN et al. (1992) e MLEKUSCH et al. (1993). Os grupos CASIN mostraram sempre um nível de colesterol mais elevado do que no grupo CASSA. Partindo de T0, com $2,28 \pm 0,14$ mg/g de colesterol hepático, o grupo que consumiu TCL em maior concentração na dieta (CASIN-30/30) apresentou níveis mais elevados chegando a $6,57 \pm 0,53$ mg/g, obtendo diferença estatisticamente significativa de todos os grupos e nos três tempos

medidos. A partir destes dados concluiu-se que o óleo de soja em altas concentrações, como fonte de TCL, eleva o nível do colesterol hepático.

5.3.2. Perfil dos ácidos graxos hepáticos face a composição dos ácidos graxos consumidos

CLARCKE et al. (1977b) examinaram cuidadosamente o papel específico dos ácidos graxos da dieta na síntese dos lipídios, testando o grau de absorção de cada um deles, controlando o consumo de carboidratos, concluindo que os ácidos graxos são também fatores importantes na regulação da síntese de lipídios. Em 1983, HERZBERG relatou que a lipogênese, em ratos alimentados com gordura de coco, foi menor quando comparada à dos animais que consumiram óleo de soja. E BROUSSEAU et al. (1995) trabalhando com macacos concluíram que a composição dos TAG hepáticos é um reflexo da composição dos ácidos graxos da dieta e que a gordura monoinsaturada é comparável com a polinsaturada.

Os ácidos graxos saturados de cadeia longa absorvidos da dieta influem na composição dos ácidos graxos dos tecidos; fazem parte das lipoproteínas como TAG que são transportados nos quilomícrons ou como ácidos graxos livres via circulação portal para o fígado. Esta diferença pode influenciar na retirada dos TAG das lipoproteínas intravasculares e no metabolismo dos lipídios nos órgãos que os utilizam (WALL et al., 1994). Os ácidos graxos caprílico (8:0) e capróico (10:0) são transportados predominantemente via circulação portal como ácidos graxos não esterificados e rapidamente oxidados no fígado (BACH & BABAYAN, 1982).

Apesar da grande proporção (56 %) de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) presentes na composição da gordura de coco usada neste experimento, os AGCM, encontrados nos fígados dos ratos que consumiram

este tipo de lipídio na dieta, apareceram em quantidades insignificantes. Este fenômeno é explicado pela rápida oxidação deste tipo de ácido graxo pelo fígado e pela afinidade da acil-CoA:1,2-diacilglicerol aciltransferase pelos ácidos graxos com menos de 12 carbonos (RUSTAN et al, 1988).

A composição dos ácidos graxos dos lipídios utilizados na formulação das dietas foi determinada por cromatografia gasosa (Tabela 4) e demonstraram resultados semelhantes aos encontrados por MASCIOLI et al. (1987) e BABAYAN (1987), com maior concentração de ácido linoléico (18:2) para o óleo de soja e de ácido láurico (12:0) para a gordura de coco.

Trabalhando com substituição parcial de ácidos graxos saturados por insaturados, ABBEY et al. (1994) concluíram que o tipo de gordura ingerida na dieta refletiu na composição dos ácidos graxos do plasma. No atual experimento foram encontradas perfis semelhantes dos ácidos graxos do fígado de ratos alimentados com óleo de soja e gordura de coco.

A alta concentração de ácido mirístico (14:0), encontrada na composição da gordura de coco, não influenciou na sua concentração na gordura do fígado dos animais deste experimento. Já em 1965, BOLLINGER & REISER, explicaram que o ácido mirístico pode ser convertido endogenamente em ácido palmítico (16:0).

Não obstante a profunda diferença no perfil dos ácidos graxos ingeridos, especialmente na relação gordura insaturada *versus* gordura saturada (5,93 para o óleo de soja e 0,22 para a gordura de coco), o espectro dos ácidos graxos dos fígados, deste experimento, caminhou na mesma direção, como ilustrado pela elevação do ácido palmítico (16:0) e do esteárico (18:0) para todos os níveis e tipos de lipídios usados, indicando integridade metabólica na síntese de lipídios (Tabela 25).

Como os animais permaneceram saudáveis, a integridade metabólica se estenderia a todos os tecidos corporais. É conhecido que a maioria dos tecidos corporais possui um sistema complexo de enzimas para biossíntese de ácidos graxos. O sistema sintetase é um complexo multi-enzimático que inicia em acetil-CoA até a formação de um radical acílico saturado com 16 átomos de carbono. O palmitato é liberado do complexo enzimático por hidrólise e, antes de continuar em qualquer outra via, é ativado a acil-CoA.

O paralelismo de resultados, deste experimento, entre o alto conteúdo de ácido linoléico (18:2) e o reduzido nível de ácido oléico (18:1) encontrado no fígado dos animais que consumiram óleo de soja já foi descrito por BANERJEE et al. (1992) e por MLEKUSCH et al. (1993). Mas o efeito mais marcante foi a elevação do ácido linoléico (18:2) para os grupos CASSA, uma vez que a dieta continha só 3,11 % de 18:2 comparada aos 53 % dos grupos CASIN. A única diferença entre o efeito dos dois tipos de gordura colocados em alta concentração nas dietas foi na magnitude das mudanças na composição dos ácidos graxos.

5.3.3. Proteínas e glicose nos fígados

Este estudo mostrou elevação de 98 % e 100 % no nível das proteínas do fígado de T0 para T1 e decréscimo de 33 % e 46 % de T1 para T2 nos grupos CASIN-7/7 e CASSA-7/7 (Tabela 23). Nos tratamentos CASIN-30/30 e CASSA-30/30 o decréscimo chega a 78 %. O que fica patente é que, após 30 dias de dietas, a quantidade de proteínas totais é muito mais baixa e tão baixa quanto a encontrada para os ratos de dieta aprotéica, aos 15 dias. Estes fatos encaminham ao seguinte raciocínio: os fígados dos ratos aumentam a síntese protéica sensivelmente do desmame ao 15° dia. Ao 30° dia apresentam valores muito mais baixos e, finalmente, estes valores se estabelecem

independentemente das dietas oferecidas. É preciso lembrar que para as dietas hiperlipídicas, a elevação do total de lipídios nos fígados (Tabelas 12 a 21) deverá ter contribuído para a elevação da estocagem intracelular e a consequente diminuição da síntese protéica.

No trabalho de KEIM & MARES-PERLAM (1984) com esteatose hepática provocada por deficiência de ácidos graxos essenciais, a quantidade de proteína encontrada nos fígados dos ratos ($18,33 \pm 4,1$ %) no início do experimento foi muito semelhante à encontrada neste trabalho no T0 ($20,84 \pm 2,19$ %).

A pequena quantidade de glicose encontrada nos fígados dos ratos deste experimento (Tabela 24) é justificada pelas 16 horas de jejum dos animais antes do sacrifício. Os grupos que receberam maior quantidade de lipídios na dieta, independente do tipo de gordura consumida, apresentaram maior concentração de glicose hepática indicando que havia maior reserva de glicogênio no fígado. Este fato é explicado pela forte correlação positiva (0,8660) entre o nível de glicose do fígado com o consumo (0,8660) e com a absorção de lipídios da dieta.

Para HARPER et al. (1982) no fígado após refeição rica em carboidratos encontra-se até 5 % de glicogênio e que após 12 a 18 horas de jejum este pode sofrer depleção quase total. O glicogênio hepático naturalmente estará relacionado com a glicose sanguínea.

5.3. Avaliação histológica

Os hepatócitos compreendem 60% das células do fígado e 80 % do volume total. A organização estrutural das células está relacionada às funções exócrinas, endócrinas e metabólicas dos hepatócitos e ao mesmo tempo

define a bipolaridade dos hepatócitos: as faces que são adjuntas ao sinusóide têm o espaço de Disse que lhes garante intensa intimidade com o plasma sangüíneo. As microvilosidades da membrana celular dos hepatócitos aliadas às fenestrações presentes no endotélio sinusoidal ampliam infinitamente a área de contato com o plasma. As faces dos hepatócitos que se encostam com outros hepatócitos, são reforçadas por junções unitivas especializadas onde as membranas se aprofundam e formam os canais onde a bile é excretada (TANIKAWA, 1968).

O mesmo autor acima realçou que a diferença ultraestrutural entre fígado de ratos e humanos é muito pequena: fígados normais de ratos não depositam grânulos de "lipofuscina" como nos humanos e as mitocôndrias têm maior número de cristas.

No que concerne à esteatose hepática, MALLET-GUY (1973) deixa claro que este quadro caracteriza-se, entre outras coisas, por lesões das mitocôndrias com perda de cristas e matriz e/ou pela formação de membranas mielínicas no seu interior. A ausência ou rarefação do glicogênio ocorre via de regra e os canalículos biliares podem obstruir-se pelas projeções das microvilosidades dos hepatócitos. A reversão do quadro demonstra desobstrução dos canalículos biliares e intensa proliferação do Aparelho de Golgi. O R.E.R. e o glicogênio são os últimos elementos a serem restaurados.

A mesma autora, supra citada, estudou vários quadros de agressão cirúrgica ao fígado causada por hepatectomia parcial ou neurotomia da artéria hepática. Para cada ensaio obteve grupos distintos de alterações da estrutura dos hepatócitos. Considerando as duas agressões acima a autora concluiu que, embora em graus distintos, as desorganizações estruturais passaram pela alteração mitocondrial até a esteatose.

No presente trabalho encontraram-se inclusões lipídicas nos hepatócitos desde o início do experimento, isto é, no 21^o dia de vida, data do desmame dos animais. Nesta fase (Figura 8) não se pode apreciar qualquer alteração celular e são poucos os hepatócitos com reserva de glóbulos de lipídios.

O R.E.L. do hepatócito do rato aparece em quantidade pequena e talvez tenha uma continuidade estrutural com o R.E.R. Quanto ao aparelho de Golgi, que normalmente estaria nas proximidades do canalículo biliar, não esteve visível em nossas preparações. TANIKAWA (1968) disse que suas cisternas, em número de 3 a 5 paralelas, são muito evidentes no fígado em regeneração e, em contraste, muito difíceis de aparecerem no animal em jejum, como o ocorrido no presente trabalho. Os peroxissomas com membrana delimitante única foram frequentes e bem demonstrados na Figura 14.

As inclusões lipídicas variaram na dependência da quantidade de lipídios utilizados nas dietas e da atividade das enzimas lipogênicas e/ou lipolíticas. A localização tendia a ser periportal, mas eventualmente se estendia em faixa estreita até a área da veia centro lobular. Em nenhum momento pode-se admitir que os fígados não continham inclusões lipídicas, ou seja, continham reservas em gotículas desde o dia do desmame até o 53^o dia sob dietas de óleo de soja ou gordura de coco. O que se pode afirmar é que o quadro de acúmulo de gordura é progressivo e mais acentuado nas dietas hiperlipídicas. As áreas de aumento de concentração de lipídios esteatose eram pequenas, descontínuas e no ponto mais intenso levaram à necrose algumas células as quais estavam rodeadas por outras em perfeito estado de normalidade. Este quadro de alteração celular em estreita vizinhança com hepatócitos normais continua sendo informado na literatura (ALVARO et. al., 1995) e poderíamos considerá-lo focal.

Outro fato indica que "reação por esteatose" é uma resposta usual a estímulos diversificados, isto é, em fase de lesão, em fase de regeneração e ativação metabólica foi discutido por DE PAEPE et al. (1995). Os autores demonstraram que fígados de ratos que aceitam implantes de ilhotas pancreáticas reagem localmente com intensos focos de esteatose. Os ratos normais respondem com focos menores e os diabéticos com grande focos. A reação de reorganização do tecido hepático passa por uma fase de reação esteatótica cuja extensão depende da situação inicial de higidez do fígado.

Assim, as dietas hiperlipídicas conduziram os animais a maior estocagem de gordura a nível de hepatócito. Não ocorreu áreas de necrose, mas hepatócitos isolados demonstraram morte celular. Quanto ao aspecto regenerativo das dietas de recuperação, embora fosse perceptível a regeneração das células, este não chegou a regredir em 15 dias as áreas de esteatose.

Resumindo, através das observações sobretudo da ultraestrutura dos hepatócitos, parece claro que:

- O acúmulo de lipídios no fígado dos ratos experimentais foi gradativo e dependente de suas respectivas dietas. Foi um gradiente contínuo que talvez mereça a consideração de esteatose quando houver a presença de microlacunas que demonstrem o desaparecimento de hepatócitos.
- Os hepatócitos, embora regionalizados quanto à disposição no lóbulo, guardam profundas diferenças individuais porque as células em sofrimento e mortas estão sempre ao lado de hepatócitos normais.
- A ingesta exclusiva de TCM, em quantidade relativamente elevada, parece agravar a disposição para esteatose e a regeneração ultrapassa o período de 15 dias.

- Pela literatura, pode-se concluir que o prejuízo e possível desaceleração do metabolismo lipídico do hepatócito é uma resposta genérica e tanto ocorre na dieta relativamente hiperlipídica como ocorre para estímulo regenerativos ou até estímulos por agentes infecciosos.
- Após o acúmulo de lipídios, os hepatócitos sempre apresentam degeneração mitocondrial. O início do processo demonstrava o R.E.R. hipertrofiado e a seguir degeneração vacuolar do retículo.

6.CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu sugerir que ratos Wistar em crescimento:

1. Tiveram menor ganho de peso quando consumiram dietas com a mesma quantidade de gordura de coco em substituição ao óleo de soja.
2. Quando dietas hiperlipídicas foram oferecidas, regularam a ingesta de energia através da redução do consumo de alimento .
3. O tipo de gordura, quando utilizado em igual nível na dieta, não interferiu em nenhum momento nos índices nutricionais.
4. O tempo de utilização dos lipídios foi fator agravante para o aumento dos triacilgliceróis no soro sanguíneo.
5. As quantidades de óleo de soja ou de gordura de coco utilizadas nas dietas não foram suficientes para alterar a capacidade de produção e modulação do colesterol sérico; entretanto o óleo de soja em altas concentrações (30%) elevou o nível de colesterol hepático.
6. Histologicamente o excesso de lipídio, independente do tipo, causou moderada esteatose sobretudo na área periportal.
7. A mitocôndria foi a primeira organela a degenerar-se, quando o hepatócito acumulou excessivo número de gotículas de lipídios, seguida pela vacuolização do retículo endoplasmático rugoso. O processo eventualmente levou algumas células à morte.

8. A esteatose foi um fenômeno circunscrito a alguns hepatócitos e estes demonstraram independência metabólica das células vicinais, que continuaram inalteradas.
9. A esteatose do fígado sob dieta aprotéica foi muito intensa mas histologicamente idêntica aos demais quadros de esteatose.
10. A esteatose hepática regrediu quando houve redução do teor lipídico da dieta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEY, M., NOAKES, M., BELLING, G. B. and NESTEL, P. J. Partial Replacement of Saturated Fatty Acids with Almonds or Walnuts Lowers Total Plasma Cholesterol and Low-density-lipoprotein Cholesterol. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 59, n. 5, p. 995-999, May, 1994.
- ALJAWAD, N. S., FRYER, E. B. and FRYER, H. C. Effects of Casein, Soy, and Whey Proteins and Amino Acids Supplementation on Cholesterol Metabolism in Rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Elmsford, v. 2, n. 3, p. 150-155, March, 1991.
- ALVARO, D., BENEDETTI, A., GIGLIOZZI, A., BINI, A., GUARDIA, P. D. LA ROSA, T., JEZEQUEL, A. M. and CAPOCACCIA, L. Functional and Ultrastructural Features of Ethanol/Bile Salts Interaction in the Isolated Perfused Rat Liver. **Hepatology**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 1120-1129, Apr. 1995.
- ANDERSEN, T. Liver and Gallbladder Disease before and after Very Low-Calorie Diets. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 56, n. 1, p. 235S-239S, July, 1992.
- ANDRIGUETTO, J. M., GEMAEL, A., SOUZA, G. A., MINARDI, I, FLEMMING, J. S., PERLY, L., FLEMMING, R. e VINNE, J. U. **Normas e Padrões de Nutrição e Alimentação Animal**. Paraná: Editora e Publicitária LTDA. 1990. 140 p.

- AOYAMA, Y., ISHIKAWA, T., AMANO, N. and YOSHIDA, A. Lipid Accumulation in the Liver of Rats Fed a Soy Protein Isolate Diet with Excess Cystine, and its Prevention by Methionine or Choline. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Elsevier, v. 56, n. 4, p. 656-659, Apr. 1992a.
- AOYAMA, Y., MATSUMOTO, H., HITOMI-OHMURA, E. and YOSHIDA, A. Fatty Liver Induced by the Addition of Excess Cystine to a Soya-bean Protein Diet in Rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Elmsford, v. 102A, n. 1, p. 185-189, May, 1992b.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 13. ed. Washington D.C.:W. Horwitz, D.C., 1980. 858p.
- AWAD, A. B. and CHATTOPADHYAY, J. P. Effect of Dietary saturated Fatty Acid on Hormone-sensitive Lipolysis in Rat Adipocytes. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 116, n.6, p.1088-1094, June, 1986.
- BABAYAN, V. K. Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids. **Lipids**, Champaign, v. 22, n. 6, p. 417-420, June, 1987.
- BACH, A. C. and BABAYAN, V. K. Medium-chain Triglycerides: An Update. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 36, n. 4, p. 950-962, Nov. 1982.
- BAKER, H. J., LINDSEY, J. R. and WEISBROTH, S.H. The Laboratory Rat. Vol. I. **Biology and Diseases**. Orlando, Florida. USA: Academic Press, INC. 1979. p. 83-95.
- BALLARD, F.J. and HANSON, R.W. Changes in Lipid Synthesis in Rat Liver During Development. **Biochemical Journal**, Essex, v. 102, n. 4, p. 952-958, 1967a.

- BALLARD, F. J. and HANSON, R. W. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Pyruvate Carboxylase in Developing Rat Liver. *Biochemical Journal*, Essex, v. 104, n.3, p. 866-871, Sept. 1967b.
- BANERJEE, I., SAHA, S. and DUTTA, J. Comparison of the Effects of Dietary Fish Oil with Different n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Compositions on Plasma and Liver Lipids in Rats. *Lipids*, Bethesda, v.27, n. 6, p. 425-428, June, 1992.
- BARROS COELHO, R. de . *Anatomia patológica das afecções hepáticas*. Universidade Federal de Pernambuco: Editorara Univ. Pernambuco. 1971. cap.1 e 2, p. 14-77.
- BARTH, C. A. and PFEUFFER, M. Dietary Protein and Atherogenesis. *Klim Wochenschs*, v. 66, n. 2, p.135-143, Feb. 1988.
- BENDER, F. E., DOUGLAS, L. W. and KRAMER, A. *Statistical Methods for Food and Agriculture*. Westport, Avi Publishing Company. Inc. , 1982. p.91-94.
- BERNAL, C. A., VAZQUEZ, J. A. and ADIBI, S. A. Liver Triglyceride Concentration and Body Protein Metabolism in Ethanol-Treated Rats: Effect of Energy and Nutrient Supplementation. *Gastroenterology*, Philadelphia, v.103, n. 1, p.289-295, July, 1992.
- BEVERLEY, D.and ARTHUR, R. Fatty Liver and Medium Chain Triglyceride (MCT) Diet. *Archives of Diseases in Childhood*, New York:Raven Press, v. 63, p.840-842, 1988.
- BEYNEN, A. C., BOOGAARD, A., van LAACK, H. L. J. M. and KATAN, M. B. Cholesterol Metabolism in Two Strains of Rats with High or Low Response of Serum Cholesterol to a Cholesterol-Rich Diet. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v.114, n. 9, p.1540-1651, Sept. 1984.

- BHATTACHARYA, S., BALASUBRAMANIAN, S. and SIMONS, A. Role of the Liver in Low-Density-Lipoprotein Catabolism in the Rat. **Biochemical Journal**, Essex, v. 220, n. 2, p.333-336, Nov. 1984.
- BHATTACHARYA, S., BALASUBRAMANIAN, S. and SIMONS, A. Regulation of Low-Density-Lipoprotein metabolism in the Rat. **The Biochemical Journal**, Essex, v. 234, n. 2, p.493-496, March, 1986.
- BLIGH, E.G. and DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BOLLINGER, J. N. and REISER, R. The Metabolic Fate of Fatty Acids Derived from Dietary Triglycerides. **The Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 42, n. 12, p.1130-1133, Dec. 1965.
- BOUWENS, L., DE BLASER, R., VANDERKERKEN, K., GEERTS, B. and WISSE, E. Liver Cell Heterogeneity: Functions of Non-Parenchymal Cells. **Enzyme**, v. 46, p.155-168, 1992.
- BOUZIANE, M., PROST, J. and BELLEVILLE, J. Changes in Serum and Lipoprotein Fatty Acids of Growing Rats Fed Protein-Deficient Diets with Low or Adequate Linoleic Acid Concentrations. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 10, p. 2037-2046, Oct. 1992.
- BRAET, F., ZANGER, R., BAEKELAND, M., CRABBÉ, E., van der SMISSEN and WISSE, E. Structure and Dynamics of the Fenestrae-Associated Cytoskeleton of Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cells. **Hepatology**, Philadelphia, v.21, n. 1, p.180-189, Jan. 1995.
- BROUSSEAU, M. E., ORDAVAS, J. M., OSADA, J., FASULO, J., ROBINS, S. J., NICOLOSI, R. J. and SCHAEFER, E. J. Dietary Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids are Comparable in Their Effects on Hepatic Apolipoprotein mRNA Abundance and Liver Lipid Concentrations When Substituted for Saturated Fatty Acids in Cynomolgus Monkeys. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3, p. 425-436, Mar. 1995.

- BUCK, D. R. and BALES, J. Maternal Dietary Magnesium Effects on Lactation Success and on Milk Yield and Composition in the Rat. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v.113, n. 12, p. 2421-2431, Dec. 1983.
- CAMARGO, J. L. V.; ANGELELI, A. Y. O.; BURINI, R. C. and CAMPANA, A. O. Hepatic Lesions in Protein-Deficient Adult Rats. *British Journal Experimental Pathology*, Oxford, v. 59, n. 1, p. 158-166, Jan. 1978.
- CARREAU, J.P., LORIETTE, C., COUNIS, R. et KETEVI, P. Demasquage des Recepteurs de la Noradrenaline par Enrichissement en Acide Linoleique des Phospholipides Membranaires de la Célule Adipeuse (Relative non-Masking of Noradrenaline Receptors by Linoleic Acid-rich Phospholipids in Fat Cell Membranes). *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier, v. 280, n. 2, p. 440-443, Feb. 1972.
- CHANEZ, M., BOIS-JOYEUX, B., ARNAUD, M. J. and PERET, J. Metabolic Effects in Rats of Diet with a Moderate Level of Medium-Chain Triglycerides. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v.121, n.5, p. 585-594, May, 1991.
- CHANG, S. and SILVIS, S. E. Fatty Liver Produced by Hyperalimentation of Rats. *American Journal of Gastroenterology*, Philadelphia, v.62, n. 6, p. 410-418, June, 1974.
- CHURCH, D. C. and POND, W. G. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 425p.
- CLANDININ, M. T., CHEEMA, S., FIELD, C. J. GRAG, M. L. VENKATRAMAN, J. and CLANDININ, T. R. Dietary Fat: Exogenous Determination of Membrane Structure and Cell Function. *FASEB Journal*, Bethesda, v. 5, n. 3, p. 2761-2769, March, 1991.
- CLARKE, C. K., O'DONOGHUE, P. N., SCOTT, P. P. and WARD, R. J. Dietary Standards for Laboratory Animals,: Report of the Laboratory Animals, Center Diets Advisory Committee. *Laboratory Animals*, Essex, v. 11, n. 1, p. 1-28, Jan. 1977a.

- CLARKE, S. D., ROMSOS, D. R. and LEVEILLE, G. A. Differential Effects of Dietary Methyl Esters of Long-Chain Saturated and Polyunsaturated Fatty Acid on Rat Liver and Adipose Tissue Lipogenesis. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.107, n. 7, p.1170-1181, July, 1977b.
- DE PAEPE, M. E., KEYMEULEN, B., PIPELEERS, D. and KLÖPPEL, G. Proliferation and Hypertrophy of Liver Cells Surrounding Islet Grafts in Diabetic Recipient Rats. **Hepatology**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 1144-1153, Apr. 1995.
- DERSE, P. H. Evaluation of Protein Quality (Biological Method). **Journal of the A.O.A.C.** Arlington, Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International, v. 43, n. 1, p. 38-41, Feb. 1960.
- DIANZANI, M. U. **Biochemical Aspects of Fatty Liver**. In: Slater, T. F. ed. **Biochemical Mechanisms of Liver Injury**. New York: Academic Press., 1978. 45p.
- DOHERTY, J. F., GOLDEN, M. H. N. and BOOKS, S. E. H. Peroxisomes and the Fatty Liver of Malnutrition: an Hypothesis. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 54, n. 4, p. 674-677, Oct.1991.
- DREYFUS, C. A. and HOVIG, T. The Effects of Cholesterol/Fat Feeding on Lipid Levels and Morphological Structures in Liver, Kidney and Spleen in Guinea Pigs. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 85, n. 9, p. 1-18, Sept. 1977.
- ECELBARGER, C. A. and GREGER, J. L. Dietary Citrate and Kidney Function Affect Aluminium, Zinc and Iron Utilization in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.121, n. 18, p.1755-1762, Nov.1991.
- EDWARDS, D. G. and DEAN, J. The Responses of Rats to Various Combinations of Energy and Protein. II. Diets Made from Natural Ingredients. **Laboratory Animals**, Essex, v. 19, n. 4, p. 336-343, Apr. 1985.

- FORSYTHE III, W. A. Soy Protein, Thyroid Regulation and Cholesterol Metabolism. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, n. 3S, p. 619S-623S, Mar. 1995.
- FRASER, R., DOBBS, B. R. and ROGERS, G. W. T. Lipoproteins and the Liver Sieve: The Role of the Fenestrated Sinusoidal Endothelium in Lipoprotein Metabolism, Atherosclerosis, and Cirrhosis. *Hepatology*, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 863-874, Mar. 1995.
- GALLUSER, M., CZERNICHOW, B., DREYFUS, H., GROSSÉ, F., GUÉROLD, B. KACHELHOFFER, J., DOFFOEL, M. and RAUL, F. Comparison of Different Lipid Substrates on Intestinal Adaptation in the Rat. *Gut*, London, v. 34, n. 8, p.1069-1074, Aug. 1993.
- GARG, M. L., WIERZBICKI, A. A., THOMPSON, A. B. R. and CLANDININ, N. M. Dietary Saturated Fat Level Alters Competition between L-Linoleic Acid . *Lipids*, Bethesda, v. 24, n. 5, p.334-339, May, 1989.
- GEERTS, A., LAZOU, J. M., BLESER, P. and WISSE, E. Tissue Distribution, Quantitation and Proliferation Kinetics of Fat-Storing Cells in Carbon Tetrachloride-Injured Rat Liver. *Hepatology*, Philadelphia, v. 13, n. 6, p.1193-1202, June, 1991.
- GELIEBTER A., TORBAY, N. BRACCO, E. F., HASHIM, S. A. and VAN ITALLIE, T. B. Overfeeding with Medium-chain Triglyceride Diet Results in Diminished Deposition of Fat. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 37, n. 1, p. 1-4, Jan. 1983.
- GOHEEN, S. C., LARKIN, E. C., MANIX, M. and RAO, G. A. Dietary Arachidonic Acid Reduces Fatty Liver, Increases Diet Consumption and Weight Gain in Ethanol-Fed Rats. *Lipids*, Champaign, v.15, n. 5, p.328-336, May, 1980.
- GOHEEN, S. C., LARKIN, E. and RAO, G. A. Severe Fatty Liver in Rats Fed a Fat-Free Ethanol Diet, and its Prevention by Small Amounts of Dietary Arachidonate. *Lipids*, Champaign, v.18, n. 4, p. 285-290, Apr. 1983.

- GORMAN, R. R.; TEPPERMAN, H. M. and TEPPERMAN, J. Effects of Starvation, Refeeding, and Fat feeding on Adipocyte Ghost Adenyl Cyclase Activity. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.31, n.2, p.276-280, Apr. 1972.
- GREGER, J. L. Using Animals to Assess Bioavailability of Minerals: Implications for Human Nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n. 10, p. 2047-2052, Oct. 1992.
- GUMUCIO, J. J. Hepatocyte Heterogeneity: The Coming of Age from the Description of a Biological Curiosity to a Partial Understanding of its Physiological Meaning and Regulation. **Hepatology**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 154-160, Jan. 1989.
- GURR, M. I. **Role of Fats in Food and Nutrition**. Elsevier:Applied Science Publishers LTD. New York. USA. 1986. 170 p.
- GUZMÁN, M. and CATRO, J. Zonation of Fatty Acid Metabolism in Rat Liver. **Biochemical Journal**, Essex, v. 264, n. 1, p. 107-113, Nov. 1989.
- HAGVE, T. A., MYRSETH, L. E., BLOMHOFF, J. P., CHRISTOPHERSEN, B. ELGJO, K. GJONE, E. and PRYDZ, H. Liver Steatosis in Hipobetalipoproteinemia. **Journal of Hepatology**, Philadelphia, v. 13, n. 1, p.104-111, July, 1991.
- HARKNESS, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 1. ed. São Paulo:Roca Ltda. Merusse I, 1993. p.48-55.
- HARPER, H. A., RODWELL, V. W. and MAYES, R. A. **Manual de Química Fisiológica**. 5. ed. São Paulo:Atheneu Editora, 1982.
- HARTMAN, L. and LAGO, R.C.A. Rapid Preparation of Fatty Acid Methyl Esters from Lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 7, p. 475-476, July, 1973.

- HASHIM, S. A., TANTIBHEDYANGKUL, P. Medium Chain Triglyceride in Early Life: Effects on Growth of Adipose Tissue. *Lipids*, Bethesda, v.22, n. 6, p. 429-434, June, 1987.
- HAUG, A. and HOSTMARK, A.T. Lipoprotein Lipases, Lipoproteins and Tissue Lipids in Rats Fed Fish Oil or Coconut Oil. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 117, n. 6, p. 1011-1017, Juny, 1978.
- HAVEL, R. J. Regulation of Lipoprotein Metabolism by Lipoprotein Receptors. *Atherosclerosis Reviews*, Elsevier, v. 17, n. 1, p. 1-8, Jan. 1988.
- HAVEL, R. J.; KANE, J. P.; BALASSE, E. O.; SEGEL, N. and BASSO, L. V. Splanchnic Metabolism of Free Fatty Acids and Production of Triglycerides of Very Low Density Lipoproteins in Normotriglyceridemic and Hipertriglyceridemic Humans. *The Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 49, p. 2017-2035, May, 1970.
- HAZELL, S. L.; EICHBERG, J. W.; LEE, D. R.; ALPERT, L.; EVANS Jr., D. G.; EVANS, D. J. and GRAHAM, D. Y. Selection of the Chimpanzee Over the Baboon as a Model for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, Philadelphia, v. 103, n. 3, p. 848-854, July, 1992.
- HERMAN, S., SEDIAOETAMA, A. D., KARYADI, D. and BEYNEN, A. C. Influence of Background Composition of the Diet on the Lipemic Effect of Fish Oil vs. Corn Oil in Rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 121, n. 5, p. 622-630, May, 1991.
- HERZBERG, G. R. The Influence of Dietary Fatty Acid Composition on Lipogenesis. *Advances in Nutritional Research*, Edinburg, v. 5, p. 221-253, 1983.
- HEVIA, P. and VISEK, W. J. Liver Serum Lipids and Lipoproteins of Rats Fed 5% L-Lysine. *Lipids*, Bethesda, v.15, n. 2, p. 95-99, Feb. 1980.

- HEVIA, P., KARI, F. W., ULMAN, E. A. and VISEK, W., J. Serum and Liver Lipids in Growing Rats Fed Casein with L-Lysine. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.110, n. 6, p.1224-1230, June, 1980.
- HORIGOME, T. and CHO, Y. S. Dietary Casein and Soybean Protein Affect the Concentrations of Serum Cholesterol, Triglyceride and Free Amino Acids in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 11, p. 2273-2282, Nov. 1992.
- HUI, A., KAWASAKI, S., MAKUCHI, M., NAKAYAMA, J., IREGAMI, T. and MIYAGAWA. Liver Injury Following Normothermic Ischemia in Steatotic Rat Liver. **Hepatology**, Philadelphia, v. 20, n.5, p. 1287-1293, Nov., 1994.
- JUNGERMANN, K. Zonal Liver Cell Heterogeneity. **Enzyme**, v. 46, p. 5-7, 1992.
- JUNGERMANN, K. and THURMAN, R. G. Hepatocyte Heterogeneity in the Metabolism of Carbohydrates. **Enzyme**, v. 46, p. 33-58, 1992.
- JUNGERMANN, K. and KATZ, N. Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. **Physiological Review**, v. 69, n.3, p. 708-764, July, 1989.
- KAMINSKI, D. L., ADAMS, A. and JELLINEK, M. The Effect of Hyperalimentation on Hepatic Lipid Content and Lipogenic Enzyme Activity in Rats and Man. **Surgery**, v. 88, n. 1, p. 93-100, Jan. 1980.
- KATAN, M. B., ZOCK, P. L. and MENSINK, R. P. Effects of Fats and Fatty Acids on Blood Lipids in Humans:an Overview. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, n. 6S, p. 1017S-1022S, Dec. 1994.

- KATHER, H., WIELAND, E., SCHEURER, A., VOGEL, G., WILDENBERG, U. and JOOST, C. Influences of Variation in Total Energy Intake and Dietary Composition on Regulation of Fat Cell Lipolysis in Ideal-Weight Subjects. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 80, n. 2, p. 566-572, Aug. 1987.
- KEEN, C. L., LÖNNERDAL, B., CLEGG, M. and HURLEY, L. S. Developmental Changes in Composition of Rat Milk: Trace Elements, Minerals, Protein, Carbohydrate and Fat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 111, n.2, p. 226-230, Feb. 1981.
- KEIM, N. L. and MARES-PERLMAN, J. L. Development of Hepatic Steatosis and Essential Fatty Acid Deficiency in Rats with Hypercaloric, Fatt-free Parenteral Nutrition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, n.10, p. 1807-1815, Nov.1984.
- KOCH, O. R., GALEOTTI, T, BARTOLI, G. M. and BOVERIS, A. Alcohol-Induced Oxidative Stress in Rat Liver. **Xenobiótica**, New York, v. 21, n.8, p. 1077-1084, Aug. 1991.
- KRITCHEVSKY, D., TEPPER, S.A., BISES, G. and KLURFELD, D. M. Influence of Cocoa Butter on Cholesterol Metabolism in Rats: Comparison with Corn Oil, Coconut Oil and Palm Oil. **Nutrition Research**, Elmsford, v. 3, n.2, p. 229-236, Feb. 1983.
- KUIPERS, F.; NAGELKERKE, J. F.; BAKKERE, N. H.; HAVINGA, R.; VAN BERKEL, J. C. and VONK, R.J. Processing of cholestery Ester from Low-Density-Lipoprotein in the Rat. **The Biochemical Journal**, Essex, v. 257, n. 3, p. 699-704, Feb. 1989.
- LAVAU, M. M. and HASHIM, S. A. Effect of Medium Chain Triglyceride on Lipogenesis and Body Fat in the Rat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.108, n. 4, p. 613-620, Apr. 1978.

- LEAF, A. and WEBER, P. C. Cardiovascular Effects of n-3 Fatty Acid. **The New England Journal of Medicine**, West Portway, v. 318, n.9, p. 549-557, Mar. 1988.
- LIENER, I. E. and THOMPSON, R. M. In vitro and in vivo Studies on the Digestibility of the Major Storage Protein of Navy Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Qualitas Plantarum; Plant Foods for Human Nutrition**, The Hauge, v. 30, n. 1, p. 13-25, Jan. 1980.
- LING, P. R., HAMAWY, K. J., MOLDAWER, L. L., ISTFAN, N., BISTRAN, B. R. and BLACKBURN, G. L. Evaluation of the Protein Quality of Diets Containing Medium- and Long-Chain Triglyceride in Healthy Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 116, n. 3, p. 343-349, Mar. 1986.
- LOCKWOOD, E. A.; BAILEY, E. and TAYLOR, C.B. Factors Involved in Changes in Hepatic Lipogenesis During Development of the Rat. **Biochemical Journal**, Essex, v. 118, n. 1, p. 155-162, July, 1970.
- LOMBARDI, B., PANI, P. and SCHLUNK, F. F. Choline-deficiency Fatty Liver: Impaired Release of Hepatic Triglycerides. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 9, n. 4, p. 437-446, July, 1968.
- LOMBARDI, B. Considerations of the Pathogenesis of Fatty Liver. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 15, p. 1-2, Jan. 1966.
- LOTTENBERG, A. M. **Dieta na Hipercolesterolemia**. In: QUINTÃO, E. C. R. **Colesterol e Aterosclerose**. Rio de Janeiro: Qualitymark Ed., 1992. cap. 10, p.177-1193.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-273, Nov. 1951.
- LUCKEY, T. D.; MENDE, T. J. and PLEASANTS, J. The Physical and Chemical Characterization of Rat's Milk. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 54, n. 3, p. 345-359, May, 1954.

- LYNCH, J. W. and BAILEY, J. W. Dietary Intake of Short-Chain Triglyceride Triatin vs. Long-Chain Triglycerides Decreases Adipocyte Diameter and Fat Deposition in Rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, n. 5, p.1267-1273, May, 1995.
- MALLET-GUY, Y. *Atlas de Microscopie Électronique du Fois*. 1. ed. Paris: Masson et Cie., 1973. 131 p.
- MARTINES-HERNANDEZ, A.. The Hepatic Extracellular Matrix. I. Electron Immunohistochemical Studies in Normal Rat Liver. *Laboratory Investigation*, Baltimore, v. 51, n. 1, p. 57-74, July, 1984.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. and AMENTA, P. S. The Hepatic Extracellular Matrix. II Ontogenesis, regeneration and Cirrhosis. *Virchows Archiv. A. Pathological Anatomy and Histopathology*, Verlag, v. 423, n. 2, p. 77-84, Jan.1993.
- MARTINS, F. M., WENBERG, A., MEURLING, S., KIHBERG, R. and LINDMARK, L. Serum Lipids and Fatty Acid Composition of Tissue in Rats on Total Parenteral Nutrition (TPN). *Lipids*, Bethesda, v. 19, n. 10, p. 728-737, Oct. 1984.
- MASCIOLI, E. A., BISTRAN, B.R.,BABAYAN, V. K. and BLACKBURN, G. L. Medium Chain Triglycerides and Structured Lipids as Unique Nonglucose Energy Sources in Hyperalimentation. *Lipids*, Bethesda, v. 22, n. 6, p.421-423, June, 1987.
- McGUIRE, R. F., BISSEL, D. M., BOYLES, J. and ROLL, F. J. Role of Extracellular Matrix in Regulating Fenestrations of Sinusoidal Endothelial Cells Isolated from Normal Rat Liver. *Hepatology*, Philadelphia, v.15, n. 6, p, 989-997, June, 1992.
- MENENDEZ, R. C. *Animales de Laboratorio en las Investigaciones Biomédicas*. Cuba, La Habana: Editorial Ciências Médicas, 1985. 203 p.

- MEZEY, E. Progress in Hepatology, Liver Disease and Nutrition. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.74, n. 4, p. 770-783, Apr.1978.
- MILLER, D. S. and BENDER, A. E. The Determination of the Net Utilization of Protein by a Shortened Method. **British Journal of Nutrition**, Edinburgh, v. 9, n.8, p.382-389, Sept. 1955.
- MILNER, J. A. and PERKINS, E.G. Liver Lipid Alterations in Rats Fed Arginine Deficient Diets. **Lipids**, Bethesda, v.13, n. 8, p.563-565, Aug. 1978.
- MITCHELL, H. H. A Method of Determining the Biological Value of Protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 58, n. 3, p. 873-903, Jan. 1924.
- MLEKUSCH, W., CELEDIN, C., ALOIA, R. C. and MOLLER, R. Effect of High Fat Diet on Phospholipid Class Distribution and Fatty Acid Composition in Rat Liver. **International Journal of Biochemistry**, Elmsford, v. 25, n. 11, p. 1539-1547, Nov. 1993.
- MONSMA, C. C. and NEY, D. M. Interrelationship of Stearic Acid Content and Triacylglycerol Composition of Lard, Beef Tallow and Cocoa Butter in Rats. **Lipids**, Bethesda, v. 28, n. 6, p. 539-547, June, 1993.
- MORAN Jr., E. T. Digestão e Absorção de Gorduras. In: **Fisiologia da Digestão e Absorção de Aves**. Campinas:Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994. p.77-82.
- MUZTAR, A. J. and SLINGER, S. J. An Evaluation of the Nitrogen Correction in the Metabolizable Energy Assay. **Poultry Science**, College Station, v. 60, n. 4, p. 835-839, Apr. 1981.
- NAKAMURA, M. T, TANG, A. B., VILLANUEVA, J, HALSTED, C. H. and PHINNEY, S. Reduced Tissue Arachidonic Acid Concentration with Chronic Ethanol Feeding in Miniature Pigs. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 56, n. 3, p. 467-474, Sept. 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Subcommittee on Laboratory Animals**, n.10, 3.ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1978. 96 p.

NAYAK, N. C. **Nutritional Liver Diseases**. . In: ISHAK, K. G. and SHARP H. L. **Metabolic Errors and Liver Diseases**. .Livingstone:Edited by MacSween, 1987. Cap. 4.

NEVES, J.; FACCIN, G. L e TAVARES-DO-CARMO, M. G. Efeito da ingestão de álcool durante a lactação sobre a Composição do Leite Materno e sobre o crescimento da Prole: Estudo em Ratas. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, Campinas, v. 8, n. 1, p.65-82, Jan/Jun. 1995.

NORUN, K. R. Dietary Fat and Blood Lipids. **Nutrition Reviews**, New York, v. 50, n.4, p.30-37, Apr. 1992.

OTTO, D. A., BALTZELL, J. K. and WOOTEN, J. T. Reduction in Triacylglycerol Levels by Fish Oil Correlates with Free Fatty Acid Levels in *ad libitum* Feed Rats. **Lipids**, Bethesda, v. 27, n. 12, p. 1023-1017, Dec. 1992.

PARRISH, C. C.; PATHY, D. A. PARKES, J. G. and ANGEL, A. Dietary Fish Oils Modify Adipocyte Structure and Function. **Journal of Cellular Physiology**, v. 48, n. 3, p. 493-502, Sept. 1991.

PELLET, P. L. and YOUNG, V. R. **Nutritional Evaluation of Protein Foods**. Tokyo: The United Nations University, 1980. p - 62.

PITTMAN, R. C., GREEN, S. R., ATTIE, A. D. and STEINBERG, D. A Device for Quantifying Degradation of Plasma Proteins Catabolized by Lysosomal Mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 254, n. 15, p. 6876-6879, Aug. 1982.

PUDELKEVICZ, C., SEUFERT, J. and HOLMANN, R. T. Requirement of the Female Rat for Linoleic and Linolenic Acids. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 94, n. 1, p.138-146, Jan. 1968.

QUIGLEY, E. M. M., MARSH, M. N., SHAFFER, J. L. and MARKIN, R. S. Hepatobiliary Complications of Total Parenteral Nutrition. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 104, n. 1, p. 286-301, Jan. 1993.

QUISTORFF, B., KATZ, N. and WITTERS, L. A. Hepatocyte Heterogeneity in the Metabolism of Fatty Acids:Discrepancies on Zonation of Acetyl-CoA Carboxylase. **Enzyme**, v. 46, n. 1-3, p. 59-71, 1992.

RAPPAPORT, A. M. Acinar units and Pathophysiology of the Liver. In: **The Liver Morphology, Biochemistry, Physiology** vol. 2, ROUILLER, C. H. Academic Press. London. 1963. 265 p.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H. and FAHEY Jr.,G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

REID, L. M., FIORINO, A. S., SIGAL, S. H. BRILL, S. and HOLTS, P. A.. Extracellular Matrix Gradients in the Space of Disse:Relevance to Liver Biology. **Hepatology**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p.1198-1203, June, 1992.

RINGLER, D. H., DABICH, L. Hematology and Clinical Biochemistry. In: BAKER, H. J., LINDSEY, J. R. and WEISBROTH, S. H. **The Laboratory Rat**. San Diego: Academic Press, 1979. p. 105-118.

ROGERS, A. E. and NEWBERNE, P.M. Animal Model of Human Disease. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 73, n.7, p. 817-820, Nov. 1973.

RUBIN, M., HALPERN, Z., TIETZ, A., ANTEBI, E. and LICHTENBERG, . The effect of short-term Lipid Infusion on Liver Function and Biliary Secretion in Rats. **Lipids**, Champaign, v. 27, n. 5, p. 321-325, May, 1992.

RUSTAN, A.C., NOSSEN, J. O., CHRISTIANSEN, E. N. and DREVON, C. A. Eicosapentaenoic Acid Reduces Hepatic Synthesis and Secretion of Triacylglycerol by Decreasing the Activity of Acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol Acyltransferase. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 29, n. 11, p. 1417-1426, Nov. 1988.

SALVAY, J. G. **Metabolism at a Glance**. London: Blackwell Scientific Publications. 1. ed. 1994, 95p.

SANO, M. and PRIVETT, O. S. Effects of an Essential Fatty Acid Deficiency on Serum Lipoproteins in the Rat. **Lipids**, Champaign, v. 15, n. 5, p. 337-344, May, 1980.

SASSE, D.; SPORTNITZ, U. M. and MALY, I. P. Liver Architecture. **Enzyme**, v.46, n. 1-3, p. 8-32, 1992.

SATCHITHANANDAM, S., REICKS, M., CALVERT, R. J., CASSIDY, M. M. and KRITCHEVSKY, D. Coconut Oil and Sesame Oil Affect Lymphatic Absorption of Cholesterol and Fatty Acids in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1852-1858, Nov. 1993.

SAX, H. C., TALAMINI, M. A., BRACKETT, K. and FISCHER, J. E. Hepatic Steatosis in Total Parenteral Nutrition: Failure of Fatty Infiltration to Correlate with Abnormal Serum Hepatic Enzyme Levels. **Surgery**, v. 100, n. 4, p. 697-704, Oct. 1986.

SCHRIJVER, R and PRIVETT, O. S . Effects of Dietary Long-Chain Fatty Acid on the Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in the Rat. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, n. 4, p. 619-626, Apr. 1982.

- SCHRIJVER, R. de, VERMEULEN, D. and DAEMS, V. Dose-Response Relationships Between Dietary (*n*-3) Fatty Acids and Plasma and Tissue Lipids, Steroid Excretion and Urinary Malondialdehyde in Rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 122, n. 10, p. 1979-1987, Oct. 1992.
- SÉROUGNE, C., FELGINES, C., FÉRÉZOU, J., HAJRI, T. BERTIN, C. and MAZUR, A. Hypercholesterolemia Induced by Cholesterol- or Cystine-Enriched Diets is Characterized by Different Plasma Lipoprotein and Apolipoprotein Concentrations in Rats. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, n. 1, p. 34-41, Jan. 1995.
- SGARBIERI, V. C. *Alimentação e Nutrição :Fator de Saúde e Desenvolvimento*. Campinas: Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387 pp.
- SHERLOCK, S. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 7^a ed. Oxford: Blackwell, 1985. p. 1-59.
- SHILLABEER, G., HORFORD, J., FORDEN, J. M., WONG, N. C. and LAV, D. C. W. Hepatic and Adipose Tissue Lipogenic Enzyme mRNA Levels are Suppressed by High Fat Diets in the Rat. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 31, n. 4, p. 623-631, Apr. 1990.
- SILVA, D. J. *Análises de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)*. Imprensa Universitária U.F.V. Minas Gerais. Brasil. Cap. 5. Determinação de Energia Bruta, 166 p. 1981.
- SINGER, P. and RICHTER-HENRICH, E. Stress and Fatty Liver - Possible Indications for Dietary Long-chain *n*-3 Fatty Acids. *Medical Hypothesis*, v. 36, n. 2, p. 90-94, Feb. 1991.
- SJÖBLOM, L. and EKLUND, A. Dietary Protein and Fatty Acid Composition of Liver Lipids in the Rat *Biochimica et Biophysica Acta*, Elsevier, v. 1004, n. 2, p. 187-192, Aug. 1990

- SMITH, U.; KRAL, J. and BJORNTORP, P. Influence of Dietary Fat and Carbohydrate on the Metabolism of Adipocytes of Different Size in the Rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, Elsevier, v 337, n. 2, p.278-285, Feb. 1974.
- SPADY, D. K., TURLEY, S. D. and DIETSCHY, J. M. Rates of Low Density Lipoprotein uptake and Cholesterol Synthesis are Regulated Independently in the Liver. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 26, n. 4, p. 465-472, Apr. 1985.
- SPADY, D. K.; MEDDINGS, J. B. and DIETSCHY, J. M. Kinetic Constants for Receptor-dependent and Receptor-independent Low Density Lipoprotein Transport in the Tissues of the Rat and Hamster. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v, 77, n. 5, p. 1474-1491, May, 1986.
- SPADY, D. K. and WOOLLETT, L. A. Interaction of Dietary Saturated and Polyunsaturated Triglycerides in Regulating the Processes that Determine Plasma Low Density Lipoprotein Concentration in the Rat. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 31, n. 10, p.1809-1819, Oct. 1990.
- STEIN, Y., HALPERIN, G. and STEIN, O. The Fate of Cholesteryl Linoleyl Ether and Cholesteryl Linoleate in the Intact Rat after Injection of Biologically Labeled Human Low Density Lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Elsevier, v. 663, n. 2, p.569-574, Feb. 1981.
- SUCKLING, K. E. and JACKSON, B. Animal Models of Human Lipid Metabolism. **Progress in Lipid Research**, Elmsford, v. 32, n. 1, p.1-24, Mar. 1993.
- SUSIMI, C.; LAVAU, M. and HERZOG, J. Adrenaline Responsiveness of Glucose Metabolism in Insulin-resistant Adipose Tissue of Rats Fed High-fat Diet. **Biochemical Journal**, Essex, v. 180, n. 2, p. 431-433, May, 1979.
- TANAKA, K. and MITSUSHIMA, A. A Preparation Method for Observing Intracellular Structures by Scanning Electron Microscopy. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 133, n. 2, p. 213-222, Feb. 1984.

- TANIKAWA, K. **Ultrastructural Aspects of the Liver and its Disorders.** 1. ed. Tokyo: Springer-Verlag, 1968. 239 p.
- TAYLOR, C.B., BAILEY, E. and BARTLEY, W. Changes in Hepatic Lipogenesis during Development of the Rat. **Biochemical Journal, Essex,** v. 105, n. 2, p. 717-722, Nov. 1967.
- TEPPERMAN, H. M.; DEWITT, J. and TEPPERMAN, J. Effect of High Fat Diet on Rat Adipocyte Lipolysis: Responses to Epinephrine, Forskolin, Methylisobutylxanthine, Dibutyryl cyclic AMP, insulin and nicotinic acid. **The Journal of Nutrition, Bethesda,** v. 116, n. 10, p. 1984-1991, Oct. 1986.
- TOSH, D., GEORGE, K., ALBERTI, M. M., AGIUS, L. Glucagon Regulation of Gluconeogenesis and Ketogenesis in Periportal and Perivenous Rat Hepatocytes. **Biochemical Journal, Essex,** v. 256, n. 1, p. 197-204, Nov. 1988.
- TREADWAY, J. L. and LEDERMAN, S. A. The Effects of Exercise on Milk Composition, and Offspring Growth in Rats. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda,** v. 44, n. 4, p. 481-488, Oct. 1986.
- TRISCARI, J., HAMILTON, J. G. and SULLIVAN, A. C. Comparative Effects of Saturated and Unsaturated Lipids on Hepatic Lipogenesis and Cholesterogenesis *in vivo* in the Meal-Fed Rat. **The Journal of Nutrition, Bethesda,** v. 108, n. 5, p. 815-825, May, 1978.
- TSUKAMOTO, H., FRENCH, S. W., BENSON, N., DELGADO, G., RAO, G. A. LARKIN, E. C. and LARGMAN, C. Severe and Progressive Steatosis and Focal Necrosis in Rat Liver Induced by Continuous Intragastric Infusion of Ethanol and Low Fat Diet. **Hepatology, Philadelphia,** v.5, n. 2, p. 224-232, Feb.1985.
- UNGER, R. H. and ORCI, L. Physiology and Pathophysiology of Glucagon. **Physiological Reviews,** v. 56, p. 778-826, 1976.

- VANCE, J. E. and RUSSEL, J. C. Hypersecretion of VLDL, but not HDL, by Hepatocytes from the JCR:LA-Corpulent Rat. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 31, n. 8, p. 1491-1502, Aug. 1990.
- VAN DER TUIG, J. G. and ROMSOS, D. R. Effects of Dietary Carbohydrate, Fat, and Protein on Norepinephrine Turnover in Rats. **Metabolism**, Orlando, v. 33, n. 3, p. 26-33, Mar. 1984.
- VERNON, R. G. Effects of Diet on Lipolysis and its Regulation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 51, n. 3, p. 397-408, Dec. 1992.
- VOET, D and VOET, J. D. **Biochemistry**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1990. p.636-667
- WADDELL, C. A. and DESAI, I. D. The Use of Laboratory Animals in Nutrition Research. **World Review of Nutrition and Dietetics**, London, v. 36, p. 206-222, 1981.
- WALL, K. M, DIERSEN-SCHADE, D. and INNIS, S. M. Plasma and Tissue Lipids of Piglets Fed Formula Containing Saturated Fatty Acid from Medium-chain Triglycerides with or withoth Fish Oil. **American Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 59, n. 6, p. 1317-1324, Dec.1994.
- WILLIAMS, P. C. The Use of Titanium Dioxide as a Catalyst for Large-Scale Kjeldahl Determination of the Total Nitrogen Content of Cereal Grains. **Journal of Science Food Agriculture**, London, v. 24, n. 3, p. 343-348, Mar. 1973.
- WISSE, E, ZANGER, R. B., CHARELS, K., van der SMISSEN, P. and McCUSKEY, R.S.. The Liver Sieve: Considerations Concerning the Structure and Fuction of Endothelial Fenestrae, the Sinusoidal Wall and the Space of Disse. **Hepatology**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 683-692, July/Aug. 1985.

- WOOLLETT, L. A., SPADY, D. K. and DIETSCHY, J. M. Saturated and Unsaturated Fatty Acids Independently Regulate Low Density Lipoprotein Receptor Activity and Production Rate. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 33, n.1, p. 77-88, Jan.1992.
- WOLZAC, A.; BRESSAN, R.; BRENES, R.G. A Comparison of *in vivo* and *in vitro* Estimates of Protein Digestibility of Native and Thermally Processed Vegetable Protein. **Qualitas Plantarum: Plant Food for Human Nutrition**, The Hague, v. 31, n. 1, p.31-43, Jan. 1981.
- WONG, W. W., HACHEY, D. L., CLARKE, L. L. and ZHANG, S. Cholesterol Synthesis and Absorption by $^2\text{H}_2\text{O}$ and ^{18}O -Cholesterol and Hypocholesterolemic Effect of Soy Protein. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 3S, p. 612S-618S, Mar. 1995.
- YAGIL, R., ETZION, Z. and BERLYNE, G. M. Changes in Rat Milk Quantity and Quality due to Variations in Litter Size and High Temperature. **Laboratory of Animal Science**, Essex, v. 26, n. 1, p. 33-37, Feb. 1976.
- YANG, M. G. and MICKLSEN, O. **Laboratory Animals: Nutritional Research**: In Gay, H. **Methods of Animal Experimentation**, New York: Academic Press, 1974. p. 1-40.
- YEH, Y. Y. and ZEE, P. Relation of Ketosis to Metabolic Changes Induced by Acute Medium-Chain Triglyceride Feeding in Rats. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 106, n. 1, p. 58-67, Jan. 1976.
- YOSHIDA, H. and KURYAMA, M. Genetic Lipid Storage Disease with Lysosomal Acid Lipase Deficiency in Rats. **Laboratory of Animal Science**, Essex, v. 40, n. 5, p. 486-489, Sept. 1990.
- ZONTA, E. P. and MACHADO, A.A. **SANEST: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Versão 2.1. Piracicaba: CIAGRI (Registrado na Secretaria Especial de Informática - SEI, N° 066060, Categoria A). 1989.