

***Adriane Gasparino dos Santos***

**Efeito da vitamina E-TPGS hidromiscível  
sobre as alterações nutricionais e a lesão  
hepática na colestase crônica**

**Estudo experimental em ratos jovens**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Pediatria – Área de Concentração em Pediatria da  
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para  
obtenção do título de doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Rabello Coelho**

**Botucatu  
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Santos, Adriane Gasparino dos..

Efeito da vitamina E-TPGS hidromiscível sobre as alterações  
nutricionais e a lesão hepática na colestase crônica: estudo  
experimental em ratos jovens / Adriane Gasparino dos Santos. –  
Botucatu : [s.n.], 2006.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu, 2006

Orientador: Cláudio Antônio Rabello Coelho

1.Crianças - Nutrição - Estudos experimentais 2. Vitamina E  
3.. Metabolismo

CDD 618.9239

Palavras-chave: Colestase; Hepatoproteção; Hidrossolúvel; Vitamina  
E-TPGS; Rato

**Dedicatória**

## A Deus

Minha luz, minha força e minha vida

“Você se fez presente em todos os momentos,  
firmes ou trêmulos.

E, passo a passo, pude sentir a Sua mão  
na minha, transmitindo-me a segurança  
necessária para enfrentar o meu caminho  
e seguir...

A tua presença é qualquer coisa  
como a luz e a vida, eu sinto que,  
em meu gesto, existe o Teu gesto  
e em minha voz, a Tua voz”.

Vinicius de Moraes

## *Aos meus Pais Ivete e Sérgio*

*A vocês que sacrificaram seus sonhos em favor do meu, não foram somente pais, mas amigos e companheiros, não existe exemplo maior de amor e doação em minha vida. O meu agradecimento é pequeno diante da grandeza do que fizeram por mim em todos esses anos. Amo vocês.*

Dedico especialmente esta tese ao grande amor da minha vida, **Raúl**, que me ensinou a amar incondicionalmente e que me transformou em uma pessoa melhor, muito obrigada por vir de tão longe e me fazer a mulher mais feliz deste mundo. Agradeço o carinho, o apoio, o incentivo, o companheirismo e os valiosos ensinamentos. Te amo mucho mi vida

*“Te amé incluso antes de que nacieras, sin conocerte pero sintiéndote, sin mirarte pero conociéndote, te amé porque supe que en algún lugar existías, y ahora además de amarte, puedo adorarte”*

Às minhas irmãs **Cristiane** e **Giselle** e aos meus cunhados **Salgado** e **Conde**, que demonstraram apoio e carinho constante, que mesmo a distância souberam compartilhar as minhas angústias e sobretudo, a conquista.

Aos meus pais venezuelanos, **Antônio** e **Flor**, que me ensinaram o valor de uma família unida, e o grande amor de Deus. Obrigada pelo apoio e pelas orações.

**Agradecimento especial**

Em especial, ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Rabello Coelho, pela orientação competente, pela paciência, por todo aprendizado e experiência vivida durante esses oito anos... Muito obrigada

*“Se quisermos alcançar o Bem, precisamos dedicar tempo para isso. O tempo que dedicamos a alguma coisa é a medida do nosso amor por ela. E sem amor nenhum trabalho prospera”*

*Hugo Kükelhaus*

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

À *CAPES*, pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

À *Dr<sup>a</sup>. Cilmary Sueme Kurokwa e Dr<sup>a</sup>. Rosangela Maria Barone* pelo carinho e pelas sugestões valiosas no exame geral de qualificação

Aos *Docentes do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu*, pelo incentivo científico durante a minha trajetória de Pós-graduação.

Aos queridos funcionários do *Departamento de Pediatria: Adriana, Maria do Carmo, Fabiano, Paulo e Marcelo*, pela atenção, auxílio, amizade e momentos de conforto.

Aos funcionários da *Seção de Pós-Graduação*, em especial *Regina e Nathanael*, pela atenção e paciência prestada.

Aos queridos funcionários do *Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria: Paulo S. Dionizio, Regina M. de Oliveira, Cristina Rezende e Alvina F. Ramos*, pela colaboração e disponibilidade na realização dos trabalhos laboratoriais.

À Prof Dr<sup>a</sup>. Kunie Iabuki Rabello Coelho, pelo apoio nas análises histológicas, pelo carinho e pelas palavras de conforto.

À biblioteca da Unesp, pela colaboração na busca da investigação científica.

À Adnice e ao Abílio, pela paciência e carinho, além do trabalho de diagramação e encadernação.

Aos meus Tios Tony e Regina, que me acolheram como filha durante todos os anos de luta, obrigada pelo apoio e carinho.

Aos meus Tios João e Ana, pelo incentivo e momentos de alegria proporcionado.

À minha querida Tia Consolata, por todas as oportunidades e pelo papel fundamental na conquista de mais um objetivo.

Aos meus primos Graziela, Ana Raquel, Sílvia, Alexandre, Rodrigo e Gustavo, que souberam me dar apoio e esperança na conquista dos meus objetivos, estando presente em todos os momentos da minha vida.

À Ester e Reginaldo, pessoas maravilhosas que conheci em Botucatu e me acolheram como membro de sua família, obrigada pelo apoio e dedicação, à vocês minha eterna gratidão e amizade.

À querida amiga Ana Paula Battochio, pela cumplicidade, pelo carinho e companheirismo de tantos anos, muito abrigada mais uma vez.

À **Teresa Bolzan**, pelo apoio, pela amizade e compreensão, obrigada por acreditar em mim.

Às minhas "irmãs" **Maristela Utiyama**, **Lígia Carvalho** e **Milena Artioli**, por todos os momentos de alegria, descontração e apoio.

Aos amigos **Ana Flávia** e **Laércio**, obrigada pelo inestimável carinho, amizade e força em muitos momentos de sofrimento e conquistas.

Às amigas **Rosana Fiúza**, **Fabiane Zanoti** e **Roberta Barzaghi**, que apesar da distância sempre compartilharam comigo minhas angústias e conquistas. Obrigada pela amizade e apoio

"Precisa-se de um amigo,  
Para se parar de chorar,  
Para não se viver debruçado no passado em  
busca de memórias perdidas,  
Que nos bata nos ombros sorrindo ou  
chorando, mas que nos chame de  
amigo  
Para ter-se consciência de que  
ainda se vive".

(Vinícius de Moraes)

## Epígrafe

*“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando; a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que possamos ser interrompidos antes de terminar. Fazemos da interrupção um caminho novo; da queda, um passo de dança; do medo, uma escada; da procura, um encontro; do sonho, uma realidade.”*

*(Fernando Sabino)*

## Sumário

---

<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b>	xxi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xxiv
<b>LISTA DE REDUÇÕES</b>	xxvii
<b>RESUMO</b>	xxxi
<b>ABSTRACT</b>	xxxiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1. Conceito de colestase.....	01
1.2. Importância da colestase .....	02
1.3. Causas de colestase .....	03
1.4. Atresia Biliar .....	08
1.5. Síndrome Colestática.....	10
1.6. Indicadores bioquímicos séricos de lesão e função hepática..	11
1.7. Conseqüências nutricionais da falta dos componentes da bile no intestino .....	13
1.7.1. Esteatorréia .....	13
1.7.2. Desnutrição.....	13
1.7.3. Deficiência de ácidos graxos essenciais.....	15
1.7.4. Deficiência de vitaminas lipossolúveis.....	16
1.7.4.1. Vitamina A.....	17
1.7.4.2. Vitamina D.....	18
1.7.4.3 Vitamina K.....	20
1.7.4.4. Vitamina E.....	20
1.8. Conseqüências hepáticas da retenção de componentes da bile .....	22
1.8.1. Ácidos biliares retidos que podem causar lesão hepática.....	22
1.9. Modelos de colestase .....	24
1.10. Estresse oxidativo e vitamina E.....	26

---

*Continua...*

Continuação....

<b>2. OBJETIVOS</b>	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
3.1. Delineamento experimental.....	34
3.2. Grupos experimentais.....	37
3.3. Descrição e preparo da forma hidromiscível de vitamina E – TPGS.....	38
3.3.1. Propriedades da solução.....	38
3.3.2. Propriedades térmicas.....	39
3.3.3. Propriedades solúveis e preparo da dissolução.....	39
3.4. Composição da ração utilizada no experimento.....	42
3.5. Execução do experimento.....	44
3.5.1. Acasalamento e diagnóstico de prenhez .....	44
3.5.2. Cuidados e manutenção dos animais .....	45
3.6. Procedimentos cirúrgicos.....	46
3.6.1. Ligadura e ressecção do ducto biliar comum.....	46
3.6.2. Operação simulada.....	49
3.7. Observações e medidas realizadas durante o experimento...	49
3.7.1. Ganho de peso.....	49
3.7.2. Ração ingerida.....	49
3.7.3. Aproveitamento nutricional.....	50
3.7.4. Tempo de sono após pentobarbital.....	50
3.8. Técnica utilizada na eutanásia.....	50
3.9. Medidas realizadas após a eutanásia.....	51
3.9.1. Exames bioquímicos.....	51
3.9.1.1. Dosagem sérica de AST e ALT.....	51
3.9.1.2. Dosagem sérica de proteínas e frações, triacilgliceróis, colesterol total e frações.....	51
3.9.1.3. Dosagem sérica das Vitaminas lipossolúveis A e E .....	52

Continua...

<i>Continuação...</i>	
3.9.2. Dosagem de nitrogênio da carcaça, fezes, urina e balanço nitrogenado (BN).....	53
3.9.3. Análise dos órgãos .....	54
3.9.3.1. Peso fresco dos órgãos e da carcaça.....	54
3.9.3.2. Conteúdo de água dos órgãos e da carcaça...	54
3.9.3.3. Conteúdo de gordura dos órgãos e da carcaça.....	55
3.9.4. Análise Histopatológica.....	56
3.10. Análise estatística.....	57
3.10.1. Métodos estatísticos descritivos.....	57
3.10.2. Métodos estatísticos comparativos .....	57
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
4.1. Resumo dos Resultados – 1ª hipótese.....	70
4.2. Resumo dos Resultados – 2ª hipótese.....	78
4.3. Resumo dos Resultados – 3ª hipótese.....	99
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>104</b>
5.1. Alterações nutricionais.....	104
5.2. Metabolismo lipídico.....	105
5.3. Função hepática.....	107
5.3.1. Tempo de sono após pentobarbital.....	107
5.3.2. Concentração sérica de albumina.....	108
5.4. Lesão hepática.....	110
5.4.1. Atividades séricas de ALT e AST.....	110
5.4.2. Concentração sérica de globulinas .....	111
5.4.3. Concentrações séricas de vitamina A e E.....	112
5.4.4. Peso e composição do fígado e do baço.....	113
5.4.5. Lesão histopatológica.....	115
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>118</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>121</b>
<b>ANEXO</b>	

## Quadros e Tabelas

<b>QUADRO 1 -</b>	Causas de colestase na infância .....	04
<b>QUADRO 2 -</b>	Testes bioquímicos séricos de lesão e função hepática.....	12
<b>QUADRO 3 -</b>	Grupos experimentais.....	37
<b>QUADRO 4 -</b>	Descrição da Técnica cirúrgica adaptada.....	46
<b>TABELA 1 -</b>	Características químicas da vitamina E-TPGS.....	38
<b>TABELA 2 -</b>	Composição da ração.....	42
<b>TABELA 3 -</b>	Mistura vitamínica.....	43
<b>TABELA 4 -</b>	Ração ingerida (g) .....	62
<b>TABELA 5 -</b>	Aproveitamento nutricional (g) .....	63
<b>TABELA 6 -</b>	Conteúdo de nitrogênio da carcaça (g/dL).....	64
<b>TABELA 7 -</b>	Balanço nitrogenado (g).....	65
<b>TABELA 8 -</b>	Ganho de peso (g).....	66
<b>TABELA 9 -</b>	Peso fresco da carcaça (g).....	67
<b>TABELA 10 -</b>	Conteúdo de água da carcaça (g/100g do animal)...	68
<b>TABELA 11 -</b>	Conteúdo de gordura da carcaça (g/100g do animal)	69
<b>TABELA 12 -</b>	Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da primeira hipótese.....	70
<b>TABELA 13 -</b>	Concentração sérica de triacilgliceróis (g/dL).....	73
<b>TABELA 14 -</b>	Concentração sérica de colesterol total (g/dL).....	74
<b>TABELA 15 -</b>	Concentração sérica de LDL - colesterol (g/dL).....	75
<b>TABELA 16 -</b>	Concentração sérica de VLDL - colesterol (g/dL).....	76
<b>TABELA 17 -</b>	Concentração sérica de HDL - colesterol (g/dL).....	77
<b>TABELA 18 -</b>	Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da segunda hipótese.....	78
<b>TABELA 19 -</b>	Tempo de sono (min).....	80

<b>TABELA 20</b>	- Concentração sérica de albumina (g/dL).....	81
<b>TABELA 21</b>	- Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) (UI/L).....	82
<b>TABELA 22</b>	- Atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) (UI/L).....	83
<b>TABELA 23</b>	- Concentração sérica de globulinas (g/dL).....	84
<b>TABELA 24</b>	- Concentração sérica de vitamina E (mg/dL).....	85
<b>TABELA 25</b>	- Concentração sérica de vitamina A (mg/dL).....	86
<b>TABELA 26</b>	- Peso fresco do fígado (por 100g de peso do animal)	87
<b>TABELA 27</b>	- Conteúdo de água do fígado (por 100g de peso do animal).....	88
<b>TABELA 28</b>	- Conteúdo de gordura do fígado (g/100g do animal)..	89
<b>TABELA 29</b>	- Peso fresco do baço (por 100g de peso do animal)..	90
<b>TABELA 30</b>	- Conteúdo de água do baço (g/100g do animal).....	91
<b>TABELA 31</b>	- Intensidade da fibrose portal.....	92
<b>TABELA 32</b>	- Número de áreas de necrose.....	93
<b>TABELA 33</b>	- Intensidade da proliferação ductal.....	94
<b>TABELA 34</b>	- Intensidade da esteatose hepática.....	95
<b>TABELA 35</b>	- Intensidade da degeneração hidrópica.....	96
<b>TABELA 36</b>	- Intensidade da inflamação.....	97
<b>TABELA 37</b>	- Frequência de mitose.....	98
<b>TABELA 38</b>	- Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da terceira hipótese.....	99
<b>TABELA 39</b>	- Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva de todas as variáveis.....	100

## FIGURAS

---

<b>FIGURA 1 -</b>	Vitamina E – TPGS.....	41
<b>FIGURA 2 -</b>	Demonstração do procedimento cirúrgico da ligadura e ressecção do ducto biliar comum realizado segundo a técnica adaptada. <b>A)</b> Tricotomia da parede abdominal e abertura do peritônio; <b>B)</b> Exposição do ducto biliar comum com abaixamento do duodeno, a partir da localização do fígado; <b>C)</b> Dupla ligadura do ducto biliar comum; <b>D)</b> Ressecção da porção do ducto biliar comum entre as duas ligaduras..	48
<b>FIGURAS 3 e 4 -</b>	Ração ingerida.....	62
<b>FIGURAS 5 e 6 -</b>	Aproveitamento nutricional.....	63
<b>FIGURAS 7 e 8 -</b>	Conteúdo de Nitrogênio da carcaça .....	64
<b>FIGURAS 9 e 10 -</b>	Balanço nitrogenado.....	65
<b>FIGURAS 11 e 12-</b>	Ganho de peso.....	66
<b>FIGURAS 13 e 14-</b>	Peso fresco da carcaça.....	67
<b>FIGURAS 15 e 16-</b>	Conteúdo de água da carcaça.....	68
<b>FIGURAS 17 e 18-</b>	Conteúdo de gordura da carcaça.....	69
<b>FIGURAS 19 e 20-</b>	Concentração sérica de triacilgliceróis.....	73
<b>FIGURAS 21 e 22-</b>	Concentração sérica colesterol total.....	74
<b>FIGURAS 23 e 24-</b>	Concentração sérica de LDL – colesterol.....	75
<b>FIGURAS 25 e 26-</b>	Concentração sérica de VLDL- colesterol.....	76
<b>FIGURAS 27 e 28-</b>	Concentração sérica de HDL- colesterol.....	77
<b>FIGURAS 29 e 30-</b>	Tempo de sono.....	80
<b>FIGURAS 31 e 32-</b>	Concentração sérica de albumina.....	81

---

*Continua...*

*Continuação...*

<b>FIGURAS 33 e 34-</b>	Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST).....	82
<b>FIGURAS 35 e 36-</b>	Atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT).....	83
<b>FIGURAS 37 e 38-</b>	Concentração sérica de Globulinas.....	84
<b>FIGURAS 39 e 40-</b>	Concentração sérica de vitamina E .....	85
<b>FIGURAS 41 e 42-</b>	Concentração sérica de vitamina A.....	86
<b>FIGURAS 43 e 44-</b>	Peso fresco do fígado.....	87
<b>FIGURAS 45 e 46-</b>	Conteúdo de água do fígado.....	88
<b>FIGURAS 47 e 48-</b>	Conteúdo de gordura do fígado.....	89
<b>FIGURAS 49 e 50-</b>	Peso fresco do baço.....	90
<b>FIGURAS 51 e 52-</b>	Porcentagem de água do baço.....	91
<b>FIGURAS 53 e 54-</b>	Intensidade da fibrose portal.....	92
<b>FIGURAS 55 e 56-</b>	Número de áreas de necrose.....	93
<b>FIGURAS 57 e 58-</b>	Intensidade da proliferação ductal.....	94
<b>FIGURAS 59 e 60-</b>	Intensidade da esteatose hepática.....	95
<b>FIGURAS 61 e 62-</b>	Intensidade da degeneração hidrópica.....	96
<b>FIGURAS 63 e 64-</b>	Intensidade da inflamação.....	97
<b>FIGURAS 65 e 66-</b>	Freqüência da mitose.....	98

## Reduções

---

©	“Copyrights” = ( <i>inglês</i> ) direitos autorais sobre a cópia
°C	Graus centígrados
µg/ml	Micrograma/mililitro
α-TTP	<i>Transfer tocopherol Protein</i> ( <i>inglês</i> ) proteína transportadora do tocoferol
®	Marca registrada
AGE	Ácidos graxos essenciais
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AVB	Atresia de vias biliares
CCK	Colecistoquinina
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CLT	Contagem de linfócitos
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CYP	<i>Citocrome P450</i> – Citocromo P450
<i>et al</i>	<i>et alii</i> (latim) = e outros
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
g	Gramas
GH	<i>Growth hormone</i> – Hormônio de crescimento
GP	Ganho de peso
HDL	<i>Hight-Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade

---

*Continua...*

Continuação...

<b>HPLC</b>	<i>High pressure liquid chromatography</i> – Cromatografia de alta resolução
<b>IGF-I</b>	<i>Insulin –like growth factors</i> – Fator de crescimento semelhante a insulina
<b>LRDB</b>	Ligadura e ressecção do ducto biliar comum
<b>LDL</b>	<i>Low-Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
<b>min</b>	minuto
<b>mg/kg</b>	Miligramas /kilo
<b>ml</b>	Mililitros
<b>ml/l</b>	Mililitro/litro
<b>ml/m</b>	Mililitro/minuto
<b>n.s.</b>	Não significativo
<b>NC</b>	Nitrogênio da carcaça
<b>P21</b>	21º dia pós-natal
<b>P48</b>	48º dia pós-natal
<b>P49</b>	49º dia pós-natal
<b>RBP</b>	<i>Retinol binding protein</i> – Proteína ligadora do retinol
<b>S.</b>	Significativo
<b>TAP</b>	Tempo de atividade de protrombina
<b>TCL</b>	Triacilglicerol de cadeia longa
<b>TG</b>	Triacilglicerol

Continua...

**Continuação...**

<b>TPGS</b>	<i>d-<math>\alpha</math>-tocopheryl polyethylene glycol 1000 – succinate d- alfa-tocoferol succinato de polietilino glicol 1000I</i>
<b>TSP</b>	Teste do tempo de sono após pentobarbital
<b>TTPA</b>	Tempo de protombina parcial ativada
<b>TTR</b>	Transtirretina
<b>UI</b>	Unidade internacional
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>VD</b>	Variável dependente
<b>VI</b>	Variável independente
<b>VLDL</b>	<i>Very low density lipoprotein</i> – lipoproteína de muito baixa densidade

\* Foram utilizados pontos apenas nas abreviaturas seguindo as normas de Pascholin & Spadoto, 1992.

**RESUMO**

## **Efeito da vitamina E-TPGS hidromiscível sobre as alterações nutricionais e a lesão hepática na colestase crônica**

A colestase crônica por ligadura e ressecção do ducto biliar em ratos jovens é freqüentemente utilizada como modelo experimental de atresia biliar. Na colestase ocorre má absorção de vitamina E com resultante estresse oxidativo. **Objetivos:** Sendo a vitamina E-TPGS hidromiscível, e portanto absorvível mesmo na colestase, testamos os seus efeitos sobre as conseqüências nutricionais, sobre as alterações do metabolismo lipídico e sobre a lesão hepática da colestase obstrutiva crônica no modelo experimental acima. **Métodos:** Quarenta ratos machos da raça Wister com 21 dias de vida (P21) foram divididos em 4 grupos de 10 animais e submetidos a um dos seguintes tratamentos: 1) LA-ligadura e ressecção do ducto biliar comum e administração diária de água, por gavagem, num volume de 0,02ml por grama de peso do animal; 2) LE-Ligadura e ressecção do ducto biliar comum e administração diária, por gavagem, de 25UI/kg num volume de 0,02ml de vitamina E-TPGS por grama de peso do animal de uma solução a 20% de vitamina E-TPGS; 3) SA-operação simulada e administração diária de água, por gavagem, num volume de 0,02ml por grama de peso do animal; 4) SE-operação simulada e administração diária, por gavagem, de 25UI/kg num volume de 0,02ml de vitamina E-TPGS por grama de peso do animal de uma solução a 20% de vitamina E-TPGS. Durante o experimento foi determinado o ganho de peso, a quantidade de ração ingerida, o aproveitamento nutricional (P21 a P49) e balanço nitrogenado (P42 aoP49). No P48, foram submetidos ao teste do tempo de sono após pentobarbital. No P49, foram sacrificados e colhido sangue e órgãos para seguintes determinações: peso fresco, conteúdo de água e gordura da carcaça, fígado e baço, concentrações séricas de colesterol-T, triacilglicerol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, HDL-colesterol, albumina, globulinas totais, vitamina A e E, atividade sérica das aminotransferases (ALT e AST). Também foi analisada em

cortes histológicos do fígado a intensidade de fibrose, de proliferação ductal, de necrose, de esteatose, de degeneração hidrópica, de inflamação e frequência de mitoses. Os efeitos da colestase, da vitamina E-TPGS e suas interações foram testados pelo ANOVA com dois fatores, e comparações múltiplas pareadas foram realizadas pelo teste de S.N.K. Nível de significância foi de  $p < 0,05$ . **Resultados:** A vitamina E-TPGS atenuou a diminuição do ganho de peso, do conteúdo de nitrogênio da carcaça, do balanço nitrogenado e dos níveis séricos de albumina e de vitamina A e E. Encurtou o prolongamento do tempo de sono causado pela colestase. Atenuou o aumento da atividade da ALT, dos níveis séricos de globulinas. Corrigiu a diminuição do aproveitamento nutricional, do ganho de peso, do peso fresco da carcaça e do conteúdo de gordura da carcaça. Acentuou o aumento dos níveis séricos de triacilgliceróis, de VLDL-c, do peso fresco e conteúdo de água do fígado, peso fresco do baço, da intensidade de degeneração hidrópica e inflamação. Aumentou o conteúdo de gordura do fígado e o conteúdo de água do baço. Atenuou a intensidade de fibrose, necrose e diminuiu o número de áreas de mitoses. Na ausência de colestase a vitamina E-TPGS aumentou a ração ingerida, o conteúdo gordura e o conteúdo de nitrogênio da carcaça, os níveis séricos de albumina, de vitamina A e E, o conteúdo água e gordura do fígado e diminuiu os níveis séricos de colesterol total, triacilgliceróis, VLDL-c, o tempo de sono, os níveis séricos de globulinas e a atividade sérica de ALT. **Conclusão:** A vitamina E-TPGS exerceu efeito hepatoprotetor, visto pela diminuição das alterações nutricionais, pela interferência no metabolismo lipídico e pela diminuição das lesões hepáticas.

**ABSTRACT**

**The effect of water soluble vitamin E-TPGS on nutritional alterations and hepatic lesions in chronic cholestasis-an experimental study in young rats.**

Chronic cholestasis by bile duct ligation and resection in young rats is a commonly used experimental model of biliary atresia.

Vitamin E absorption is poor in cholestasis causing oxidative stress.

**Objectives:** As Vitamin E-TPGS dissolves in water, and is therefore absorbable even in cholestasis, we tested its effects on nutritional outcome, lipid metabolism alterations, and hepatic lesion from chronic obstructive cholestasis in the above model. **Methods:** Forty 21-day-old male Wistar rats (P21) were divided into four groups of 10 and submitted to the following treatments: 1) LA – ligation and common bile duct resection with daily administration of water by gavage (0.02ml/g animal weight); 2) LE- ligation and common bile duct resection with daily administration of 25IU/Kg Vitamin E-TPGS in water by gavage (0.02mL/g wt of 20% Vitamin E-TPGS solution); 3) SA – sham operation and daily administration of water by gavage (0.02ml/g wt); and 4) SE – sham operation and daily administration of 25IU/Kg Vitamin E-TPGS in water by gavage (0.02ml/g wt of 20% Vitamin E-TPGS solution). During the experiment we measured weight gain, ingested food, diet utilization (P21 to P49), and nitrogen balance (P42 to P49). On P48, pentobarbital sleeping time was measured. On P49, euthanasia was carried out and blood and organs were collected to determine: body, liver, and spleen fresh weight, and water and fat content, serum levels of total cholesterol, triacylglycerols, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, HDL-cholesterol, albumin, total globulins, Vitamin A & E, and ALT & AST activity. Also liver histological sections were analyzed for fibrosis intensity, duct proliferation, necrosis, steatosis, hydropic degeneration, inflammation, and mitosis frequency. The effects of cholestasis, Vitamin E-TPGS, and their interactions were tested by ANOVA with two factors, and multiple paired

comparisons by the SNK test. Significance was set at  $p < 0.05$ . **Results:** Vitamin E-TPGS attenuated the reduction in weight gain, body nitrogen content, nitrogen balance, and serum albumin and Vitamin A & E levels. It cut the increased sleep time caused by cholestasis, attenuated increased ALT activity and serum globulins levels. It corrected the reduction in diet utilization, weight gain, fresh body weight, and body fat content. It accentuated the increase in serum levels of triacylglycerols and VLDL-cholesterol, fresh liver weight and water content, fresh spleen weight, and the intensity of hydropic degeneration and inflammation. It increased liver fat content and spleen water content, attenuated intensity of fibrosis and necrosis, and reduced the number of mitosis. In the absence of cholestasis, Vitamin E increased food ingestion, body fat and nitrogen content, albumin and Vitamin A & E serum levels, liver fat and water content, and reduced serum levels of total cholesterol, triacylglycerols, VLDL-cholesterol, sleep time, serum globulin levels, and ALT serum activity. **Conclusion:** Vitamin E-TPGS had a hepatic-protector effect, seen by the reduction in nutritional changes and hepatic lesions, and interference in the lipid mechanism.

# Introdução

## 1.1. CONCEITO DE COLESTASE

O termo colestase (do grego *chole* = bile, *stasis* = parada) refere-se à diminuição ou parada do fluxo biliar por interferência na produção ou no transporte da bile até o duodeno (PHILLIPS et al., 1986; WATSON & GIACOIA, 1983; POUPON et al., 2000, DAVERN & SCHARSCHMIDT, 2002). Este processo pode ser decorrente da obstrução de vias biliares, infecções, doenças metabólicas, doenças genéticas, drogas ou doenças auto-imunes. (OTTE, 2002).

A colestase é definida de acordo com os meios utilizados para seu estudo, de maneiras diferentes sob o ponto de vista de cada especialista (ERLINGER, 1991; SCHARSCHMIDT, 1990, BEZERRA, 1996, MANZANARES & MEDINA, 2003). O **clínico** identifica a colestase pela presença de icterícia, colúria, acolia ou hipocolia fecal, prurido (BERGASA, 2006), xantomas, decorrentes do acúmulo de constituintes da bile (colesterol, ácido biliar, fosfolípidos e bilirrubina) (OTTE, 2002; PAUSCH & GATZEN, 2006). O **Bioquímico** pela elevação de marcadores enzimáticos (fosfatase alcalina, gama-glutamil-transpeptidase e transaminases) (ZIMMERMAN, 1979, MÉIER-ABT, 1990).

O **fisiologista** identifica a colestase por qualquer diminuição ou interrupção de fluxo de bile, medida pelo *clearance* de substâncias eliminadas pela bile (ex. a inulina). O **patologista**, pelo

encontro de acúmulo de pigmento biliar no citoplasma dos hepatócitos e das células de Küpffer, pela formação de trombos canaliculares (bilirrubinoestase) e por degeneração plumosa dos hepatócitos (colatoestase) (SELLINGER & BOYER,1990; OH, et al., 2002). Clinicamente, as colestases podem ser divididas em duas formas, intra e extrahepática, que evoluem com alterações morfológicas, bioquímicas e clínicas semelhantes (REICHEN & SIMON, 1988).

## **1.2. IMPORTÂNCIA DA COLESTASE**

O interesse no estudo da colestase deve-se à freqüência em que esta ocorre tanto na prática clínica de crianças, quanto na de adultos (POUPON et al., 2000; ELFERINK, 2003). Sua importância em Pediatria é acentuada pela ampla variedade de causas congênitas e adquiridas no período neonatal e nos primeiros meses de vida (WATSON & GIACOIA, 1983). A incidência de colestase nestes períodos é em torno de 1 para 2.500 nascidos vivos (ALAGILLE, 1984).

Algumas doenças colestáticas apresentam alta mortalidade na ausência de tratamento. A atresia de vias biliares tem a mortalidade de 100% (SHAH & SPIVAK, 1994; BALISTRERI, 2000; SCHIF et al., 1998).

### **1.3. CAUSAS DE COLESTASE**

As causas de colestase são múltiplas e podem ser desencadeadas nas diferentes etapas da formação da bile ou do fluxo biliar (JANSEN & MULLER, 2000). As crianças são particularmente vulneráveis à colestase, por imaturidade do mecanismo de formação da bile, por maior suscetibilidade a infecção e pela maior incidência de doenças metabólicas e familiares.

As causas de colestase conforme a localização intra ou extrahepática, que inicia o processo antes e após os 4 meses de idade estão a seguir no Quadro 1 (WHITINGTON, 1996 com modificações incluídas com suas respectivas referências).

**QUADRO 1 – Causas de colestase na infância:****CAUSAS INTRA – HEPÁTICAS DUCTAIS****⇒ Obstrução biliar**

- Fibrose hepática congênita
- Doença renal policística
- Malformação da placa ductal
- Doença de Caroli
- Hipóxia e/ou isquemia hepática perinatal (VAJRO et al., 1997)
- Cisto hepático

**⇒ Síndromes ductopênicas**

- Síndrome de Alagille
- Ductopenia não sindrômica - por drogas ou genética

**⇒ Endocrinopatias**

- Hipotireoidismo
- Hipopituitarismo (displasia septo-óptica)

**⇒ Fibrose cística****⇒ Histiocitose de células de Langershans****⇒ Síndrome Hiper-IgM****CAUSAS INTRA – HEPÁTICAS HEPATOCÍTICAS****⇒ Hepatite neonatal idiopata****⇒ Infecções congênicas****A) Virais**

- Citomegalovírus
- Rubéola
- Reovirus tipo 3
- Adenovírus
- Enterovírus
- Herpes vírus: simples 1 e 2, herpes zoster, herpesvirus tipo 6
- Vírus Coxsackie
- Vírus da imunodeficiência humana
- Vírus das hepatites B, C e TT (TAJIRI et al., 2001)

**QUADRO 1 – Continuação****CAUSAS INTRA – HEPÁTICAS HEPATOCÍTICAS****B) Bacterianas**

- Sífilis
- Toxoplasmose
- Listeriose
- Tuberculose
- Malária

**⇒ Infecções adquiridas**

- Sepsis bacteriana
- Infecção do trato urinário

**⇒ Colestase associada à nutrição parenteral (WU et al., 2006)****⇒ Relacionadas com medicamentos (Carbamazepina) (FREY et al., 2002)****⇒ Síndrome colestáticas genéticas**

- Colestases intra-hepáticas familiares progressivas
- Tipo 1 – Mutação do gene FIC1 – Doença dos Byler (deficiência da ATPase P na localização de aminofosfolipídios aminados na membrana canalicular) (WALKOWIAK et al., 2006)
- Tipo 2 – Deficiência de cBSEP – “canalicular bile salt export pump” (alteração do transporte de ácidos biliares através da membrana canalicular)
- Tipo 3 – Deficiência de MDR3 – “multidrug resistance fator number 3” (alteração do transporte de fosfolipídios através da membrana canalicular)
- Colestase hereditária com linfedema (Síndrome de Aagenaes)
- Colestase familiar dos Índios Norte-Americanos
- Colestase dos esquimós da Groenlândia (deficiência de MDR3)
- Colestase familiar benigna recorrente (mutação do gene FIC1)
- Síndrome de Dubin-Johnson (deficiência de MRP3)

**QUADRO 1 – Continuação****CAUSAS INTRA – HEPÁTICAS HEPATOCÍTICAS****⇒ Doenças Metabólicas**

- Deficiência de  $\alpha_1$ -antitripsina (AN et al., 2001)
- Transtornos do metabolismo de carboidratos
  - Galactosemia
  - Intolerância hereditária a frutose
- Transtornos do metabolismo de lipídios
  - Doença de Wolman
  - Doença de Gaucher
  - Doença de Niemann-Pick
  - Mucopolidose II (doença de células azuis) (HOCHMAN et al., 2001)
- Transtornos do metabolismo de aminoácidos
  - Tirosinemia
  - Hipermetioninemia
- Transtornos do ciclo da uréia
  - Deficiência de arginase
  - Deficiência de carbamoil fosfato sintetase
- Transtornos da síntese de ácidos biliares
- Doença do armazenamento de ferro neonatal

**QUADRO 1 – Continuação****CAUSAS INTRA – HEPÁTICAS HEPATOCÍTICAS****⇒ Variadas**

- Choque/hipoperfusão
- Obstrução intestinal
- Lupus eritematoso neonatal
- Síndrome de “prune-belly”
- Histiocitose X
- Cirrose infantil da Índia
- Síndrome de Down
- Oxigenação com membrana extracorpórea
- Trissomias autossômicas
- Doença venoclusiva
- Hemocromatose neonatal
- Colestase neonatal associada a vasculopatia trombótica (DAHMS et al., 2002)

**CAUSAS EXTRA - HEPÁTICAS****⇒ Obstrução biliar**

- Atresia de vias biliares
- Cisto do colédoco
- Coledocolitíase
- Colangite esclerosante neonatal
- Tumores/Massas
- Colangite associada à histiocitose de células de Langerhans
- Perfuração espontânea do ducto biliar
- Estenose biliar
- Hipoplasia biliar

Fonte: Modificado de WHITINGTON, 1996 (as referências citadas correspondem a causas não incluídas nessa fonte)

Das doenças relacionadas acima, além da atresia de vias biliares (AVB), já citada anteriormente, as doenças intra-hepáticas (deficiência de  $\alpha_1$ -antitripsina) (TAN, 2006) constituem as principais causas de colestase crônica na infância (TELLES & TANNURI, 1994).

#### **1.4. ATRESIA BILIAR**

A atresia biliar é de etiologia não determinada e decorre de um processo inflamatório e degenerativo dos ductos biliares, é a causa mais importante de colestase (KAUFMAN et al, 1987), sendo esta a principal indicação de transplante hepático pediátrico (YOON, et al, 1997). A morte resulta, em geral, de hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes esofagianas, secundárias à hipertensão portal, decorrente da cirrose biliar secundária à colestase obstrutiva crônica.

A atresia acomete 1 em 8.000 a 12.000 nascidos vivos no âmbito mundial, (CHAPCHAP, 2001). Na infância a incidência em meninas é 1,4 a 1,7 maior do que em meninos. Distinguem-se duas formas: 1) a perinatal, adquirida, na qual a atresia é encontrada isoladamente e é a mais comum; 2) embriônica ou fetal, na qual está associada a outras anormalidades congênitas (CAUDURU, 2003).

Evidências histológicas de lesão hepática características da atresia biliar são: proliferação ductal, formação de trombos nos ductos

biliares e fibrose delimitando nódulos cirróticos. O método mais utilizado para o estudo experimental da colestase obstrutiva é a ligadura e ressecção do ducto biliar comum em ratos. A utilização de ratos jovens aproxima mais o modelo da doença de crianças (MEDEIROS, et al., 1988).

No tratamento da atresia biliar a técnica de Kasai (portoentero-anastomose) continua sendo a conduta inicial; o transplante hepático faz parte da seguinte etapa do tratamento quando necessário. A correção cirúrgica permite evitar o desenvolvimento da cirrose biliar e a insuficiência hepática secundária e sua eficácia se encontra relacionada com a precocidade de sua realização, sendo melhor a evolução quando realizada entre 45 e 65 dias de vida (DONAT et al., 2004).

Após a cirurgia de Kasai muitos paciente apresentam lesão hepática progressiva e, em aproximadamente 1/3 dos casos, ocorre insuficiência hepática, necessitando de transplante em 12 a 14 meses de pós-operatório, em outro 1/3 durante a adolescência. O restante sobrevive até a idade adulta com algum grau de hepatopatia (RAMM et al., 1998).

## 1.5. SÍNDROME COLESTÁTICA

A colestase quando intensa e prolongada pode resultar em doença hepática crônica, comprometendo as funções hepáticas.

A síndrome colestática é composta pelas seguintes manifestações clínicas:

1. Retenção de constituintes normalmente secretados ou excretados na bile (ácidos biliares, bilirrubina, colesterol e elementos traço) (LANSPA et al., 1985, PAUSCH & GATZEN, 2006), podendo progredir para lesão hepatocelular, fibrose, cirrose, hipertensão portal e falência hepática (MATHEW et al., 1994).

2. Diminuição ou ausência da passagem de componentes da bile para o intestino, diminuindo a concentração intraluminal de ácidos biliares e dificultando assim a digestão e a absorção de lipídios e vitaminas lipossolúveis, responsáveis por uma considerável diminuição no aproveitamento de energia da dieta resultando em desnutrição.

▲ A desnutrição pode contribuir para a deterioração hepática gradual, evoluindo para doença hepática, em muitos casos, a morte resulta por falência hepática (SHEPHERD, 1994).

▲ A desnutrição é o fator mais importante que interfere na sobrevida, tanto do grupo de pacientes aguardando o transplante

como no grupo pós-transplante. Nos casos sem indicação de transplante, prevenção ou tratamento de déficits nutricionais permitirá o melhor desenvolvimento pôndero-estatural e neuropsicomotor além de menor mortalidade (CARDOSO et al., 1997).

## **1.6. INDICADORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS DE LESÃO E FUNÇÃO HEPÁTICA**

Para confirmar a presença da doença hepática ou para acompanhamento de sua evolução, são utilizados os indicadores bioquímicos séricos de lesão e função hepática (DAVERN & SCHARSCHMIDT, 2002, GIANNINI et al., 2000, DUFOUR et al., 2000). Estes indicadores são classificados resumidamente no Quadro 2.

**QUADRO 2 – Testes bioquímicos séricos de lesão e função hepática**

Testes bioquímicos	Interpretação
↗ Bilirrubina urinária	- Formação e excreção da bile; produção, conjugação e excreção da bilirrubina
↗ Bilirrubina sérica (total, conjugada e não conjugada)	
↗ Aminotransferases (AST e ALT)	- Velocidade de necrose hapatocelular
↗ Fosfatase alcalina	- Retenção de ácidos biliares (colestase)
↗ Gamaglutamiltransferase	- Colestase pós-canalicular com lesão e proliferação ductal
↗ Proteínas totais	- Metabolismo protéico e formação de albumina, globulina, fibrinogênio, capacidade sintética protéica
↗ Albumina	
↗ Fibrinogênio	
↗ Globulina total e frações ( $\alpha 1, \alpha 2, \beta, \gamma$ )	- Processos inflamatórios; estimulação imune por translocação bacteriana ou hiperendotoxemia; aumento de lipoproteínas
↗ Tempo de atividade de protrombina (TAP)	- capacidade sintética de fatores coagulantes dependentes de vitamina K (exceto fator IX)
↗ Tempo de protombina parcial ativada (TTPA)	- capacidade sintética de fatores coagulantes independentes de vitamina K (exceto fator IX)
↗ Uréia e creatinina – função renal	- Capacidade de transformação de amônia em uréia
↗ Amônia	
↗ Tolerância à glicose	- Captação de glicose pelo hepatócito
↗ Tolerância à galactose	- Fosforilação da galactose
↗ Tolerância ao glucagon	- Glicogenólise
↗ Fosfolipídios e triacilglicerol	- Secreção biliar e metabolismo lipídico (PAUSCH & GATZEN, 2006)
↗ Colesterol	- Síntese e secreção biliar de colesterol (PAUSCH & GATZEN, 2006)

Fonte: MILLER, 2002 (com modificações)

## **1.7. CONSEQÜÊNCIAS NUTRICIONAIS DA FALTA DOS COMPONENTES DA BILE NO INTESTINO**

### **1.7.1. ESTEATORRÉIA**

Os ácidos biliares desempenham um papel fundamental na solubilização de gorduras e vitaminas lipossolúveis (BOOK, 1984; TOMAR, 2000). A ausência ou a diminuição da concentração de ácidos biliares no tubo digestivo, em decorrência da colestase, pode conduzir a uma concentração inadequada de ácidos biliares intraluminal para formação de micelas, resultando em má absorção de lipídios e conseqüente esteatorréia (BADLEY et al., 1970; RAMIREZ & SOKOL, 1994). A esteatorréia é caracterizada pela presença de gorduras nas fezes com grande diminuição no aproveitamento de energia e anormalidades no metabolismo dos aminoácidos.

### **1.7.2. DESNUTRIÇÃO**

A desnutrição é uma conseqüência freqüente na criança com doença hepática crônica e pode ser caracterizada por:

1. ausência de ácidos biliares no intestino que resulta em diminuição no aproveitamento de lipídios (GOUMA et al., 1986) e conseqüente hipercatabolismo protéico (FREUND et al., 1982, NG &

BALISTRERI., 2005); podendo contribuir para balanço nitrogenado negativo e perdas musculares (CARDOSO et al., 1997);

2. diminuição da ingestão alimentar caracterizada por anorexia (GOULET et al., 1987; TERAN, 1999), decorrente do aumento dos níveis circulantes de colecistoquinina (CCK) e leptina, potentes hormônios anoréxicos (ALEMAN et al., 2002, BEM-ARI et al., 2002, GARCIA-SUAREZ et al., 2004). Seus mecanismos de ação derivam-se de: a) A CCK e a leptina agem no núcleo central de saciedade inibindo o apetite e b) A CCK está envolvida na diminuição da concentração de ácido gástrico prejudicando, desta forma, o esvaziamento gástrico (TANGOKU et al., 1992, PADILLO et al., 2001);

3. aumento do gasto energético que é 30% maior do que nas crianças normais contribuindo para a utilização de proteína em forma de energia (BAVDEKAR et al., 2002, KELLY, 1997);

4. alterações no metabolismo intermediário decorrente da lesão hepatocítica, caracterizadas por alterações na síntese e na secreção do fator de crescimento semelhante à insulina – IGF-I (*insulin-like growth factor-I*) e resistência ao hormônio de crescimento (HC) (KATZ et al., 1991, AN et al., 2001).

O IGF-I e o HC são importantes para o crescimento e desenvolvimento modulando o metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (BLOMSMA et al., 1997). A diminuição hepática do IGF-I,

durante a colestase, contribui para redução da massa muscular, decorrente da diminuição na síntese protéica. A resistência ao HC está relacionada com estímulo à lipólise e perda dos estoques de gordura, além de estar relacionada com o déficit de crescimento (BUCUVALAS et al., 1990).

A desnutrição, proveniente dos vários fatores relacionados acima, pode contribuir para lesão hepática gradual (HOLT et al., 1999), retardo do desenvolvimento mental e diminuição da imunocompetência, com aumento da suscetibilidade às infecções (RAMIREZ & SOKOL, 1994; CARDOSO et al., 1997, NG & BALISTRERI., 2005).

### **1.7.3. DEFICIÊNCIA DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS**

Na colestase a deficiência de ácidos graxos essenciais (AGE) é devida à combinação entre má absorção de triacilgliceróis de cadeia longa (TCL) e suprimento inadequado de energia pela dieta (SHEPHERD, 1994). Ocorre deficiência principalmente no ácido graxo essencial linoléico (FRANCAVILLA, 2003).

Os ácidos graxos essenciais, linoléico ( $\omega$ -6) e  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3), são precursores de:

1. ácidos graxos biologicamente ativos como o ácido  $\gamma$  linoléico e o ácido araquidônico (LIMA & THOMAZ, 2001)

2. prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos

Em crianças com colestase crônica, os AGCL são pouco absorvidos (CLANDININ et al., 1981) o que eleva o risco de desenvolver deficiência de AGE. (CHIN et al., 1992, RAMIREZ & SOKOL, 1994, SHEPERD, 1994).

Adicionalmente, os ácidos graxos linoléico e linolênico podem ser oxidados como fontes energéticas se o fornecimento de energia pela dieta e a absorção calórica for inadequada (RAMIREZ & SOKOL, 1994). A deficiência desses ácidos pode causar: 1) descamação da pele; 2) prejuízo na função imunológica; 3) trombocitopenia; 4) queda de cabelo; 5) restrição do crescimento e 6) retardo no processo de cicatrização de feridas. (BARR et al., 1981; KELLY, 1995; CARNIELLI et al., 1996).

#### **1.7.4. DEFICIÊNCIA DE VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS**

A absorção das vitaminas lipossolúveis, altamente hidrofóbicas, é absolutamente dependente da presença dos ácidos biliares (MEZEI, 1984; MAGGIORE et al., 1984; PHILLIPS et al., 2001).

#### 1.7.4.1. Vitamina A

A vitamina A é um importante precursor dos pigmentos da retina sensíveis à luz e está relacionada a vitais funções biológicas, como: reprodução, visão, crescimento (BLOMHOFF & WAKE, 1991) e diferenciação celular (NEWSOME et al., 2000).

As propriedades antioxidantes dos carotenóides, que são precursores da vitamina A, conferem-lhes um papel protetor sobre as membranas biológicas que parece ser complementar ao da vitamina E, sendo, desta maneira, considerada protetora contra várias doenças, dentre elas: câncer, aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas e outras doenças degenerativas (BACHMAIR et al, 2000).

A deficiência de vitamina A é encontrada na maioria dos pacientes com colestase crônica. (BOOK, 1984, FURUCHU et al., 1998, FERANCHAK et al., 2005). Explica-se esta deficiência pela diminuição da solubilização intraluminal de vitamina A e de outros carotenóides, devido à ausência de bile no intestino e pelo prejuízo na síntese hepática e na liberação da RBP. Em consequência disso há prejuízo na liberação de vitamina A das reservas hepáticas e, portanto, suprimento inadequado das necessidades teciduais.(FERANCHAK et al., 2005).

De modo geral, os sintomas de deficiência de vitamina A aparecem quando as concentrações plasmáticas estão abaixo de 0,35 a 0,70  $\mu\text{mol/L}$  ou quando a concentração hepática de retinóides é menor

que 5 a 10 $\mu$ g/L de tecido, sendo os valores de referencia dos níveis plasmáticos de 10 a 20 $\mu$ g/dl.

Em crianças com colestase crônica a deficiência pode se manifestar por várias alterações oculares tanto em sua função retiniana (cegueira noturna) como modificações anatômicas (NG & BALISTRERI., 2005). A cegueira noturna progride para xerose conjuntival, aparecendo, posteriormente as manchas de Bitot, xerose de córnea e finalmente a queratomalácia e a ulceração da córnea (SOKOL, 1994). A pele pode ser afetada, aparecendo xerose cutânea e hiperqueratose folicular. A competência imunológica e a velocidade de crescimento também podem estar diminuídas. (SOKOL, 1994, FURUCHU et al., 1998).

Eduardo (2002) observou, em modelo experimental de colestase por dupla ligadura e ressecção do colédoco, que a suplementação com uma preparação hidromiscível de vitamina A diminui a mortalidade, fibrose hepática e proliferação ductal. Portanto, a deficiência desta vitamina agrava a lesão hepática decorrente da colestase e sua correção não só evita as manifestações acima relatadas, mas também exerce efeito hepatoprotetor na colestase.

#### **1.7.4.2. Vitamina D**

A vitamina D pode ser encontrada sob duas formas: D2 (ergocalciferol) presente na dieta e vitamina D3 (colecalciferol) obtida a partir do 7-desidrocolesterol, por ação dos raios ultravioletas sobre a pele.

Durante a colestase a absorção das vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> podem estar prejudicadas (NG & BALISTRERI., 2005). Em relação à D<sub>2</sub>, ocorre dependência do fluxo normal de bile para sua solubilização e formação de micelas. Em relação à D<sub>3</sub>, sua ativação pode ser comprometida pela presença de icterícia, que interfere na sua metabolização pelos raios ultravioletas na pele (SHERLOCK, 1989) e pela lesão hepática que pode prejudicar sua ativação (SOKOL, 1994).

As principais funções da vitamina D ativa são: estimulação da captação intestinal do cálcio e fósforo com deposição nos ossos; reabsorção óssea e reabsorção renal do cálcio, que resulta em aumento da sua concentração sérica (SITRIN & BENGGOA, 1987). Portanto, a deficiência de vitamina D diminui a absorção intestinal e a deposição do cálcio e fósforo nos ossos, com conseqüente mineralização defeituosa do osteóide (raquitismo) ou desmineralização óssea (osteomalácia) (KLEIN et al., 2002) e formação reduzida de matriz adequadamente mineralizada (osteoporose) (CHONGSRISAWAT et al., 2001).

A medida de densitometria mostra, em muitos pacientes com colestase crônica, osteopenia. (ÂNGULO et al., 1998). Esta parece ser causada não tanto pela deficiência de vitamina D quanto por alterações na matriz protéica – Pacientes com colestase crônica que normalizam seu status de vitamina D podem continuar com evidencia de doença óssea metabólica (HEUBI et al., 1990).

#### **1.7.4.3. Vitamina K**

Durante a colestase ocorre diminuição na absorção de vitamina K e diminuição da flora bacteriana produtora de vitamina K. (FLOREANI et al., 2000, MAGER et al., 2006), que pode ocorrer dentro de 2 a 3 dias após o seu início.

A má absorção de vitamina K resulta na diminuição da concentração sérica dos fatores de coagulação II, V, VII, IX e X, com aumento no tempo de protrombina (KOWDLEY et al., 1997) e manifestações hemorrágicas (SHERLOCK, 1989, MAGER et al., 2006). Estas podem se manifestar inicialmente por hematoma e epistaxes, podendo ocorrer hemorragias mais graves – hemorragias intracranianas (RAMIREZ & SOKOL, 1994; KELLY, 1995).

#### **1.7.4.4. Vitamina E**

A deficiência de Vitamina E foi bem descrita em crianças com colestase obstrutiva (TRABER et al., 1994, FLOREANI et al., 2000) e pode decorrer de vários mecanismos, dentre eles: baixo consumo dietético, má absorção e alteração durante o transporte plasmático (SOKOL et al., 1983; COPP et al., 1999).

Em condições normais a vitamina E é absorvida pela mucosa intestinal por difusão passiva. Uma vez dentro do enterócito (RODRIGUES, 1997, BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999) o  $\alpha$  e  $\gamma$  - tocoferol são incorporados com os outros produtos da digestão lipídica

aos quilomicrons recém sintetizados e às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), e são transportadas através dos linfáticos mesentéricos e do ducto torácico para a circulação sistêmica. Chegando ao sangue, a vitamina E é transportada predominantemente pelas lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL) (STOLZ, 2002). Estes mecanismos estão limitados durante a colestase resultando em um rápido desaparecimento do tocoferol do plasma (SOKOL et al, 1983; TRABER et al., 1990).

As manifestações clínicas da deficiência de vitamina E em crianças com colestase se caracterizam por doença neuromuscular progressiva (TRABER et al., 1986; ANALAY et al., 2000) que se manifestam por neuropatia periférica, com: anestesia de membros, prejuízo no equilíbrio e coordenação dos movimentos, fraqueza dos músculos proximais dos membros e oftalmoplegia (SOKOL et al., 1985; TANYEL & MANCANO, 1997). As dificuldades visuais podem ser agravadas pela retinopatia pigmentar também provocada pela falta de vitamina E. Estas alterações neurológicas degenerativas também foram encontradas em estudos experimentais de deficiência de vitamina E.

## 1.8. CONSEQÜÊNCIAS HEPÁTICAS DA RETENÇÃO DE COMPONENTES DA BILE

### 1.8.1. ÁCIDOS BILIARES RETIDOS QUE PODEM CAUSAR LESÃO HEPÁTICA

Quase todas as conseqüências de colestase resultam da retenção dos ácidos biliares hidrofóbicos no fígado (BALISTRERI, 2000). Considera-se que os ácidos biliares atuam por sua ação detergente, pela ação oxidante (através da liberação de espécies reativas de oxigênio), pela liberação de citocinas e desencadeando a apoptose (ROCHEY, 2001).

Por esse motivo, a retenção de ácidos biliares leva à lesão da membrana intracelular, disfunção mitocondrial e morte hepatocítica (ARRESE et al., 2001).

A citotoxicidade dos ácidos biliares está relacionada às propriedades detergentes e à hidrofobicidade de cada um deles. Os ácidos biliares hidrofóbicos monohidroxilados, como o ácido litocólico e seus conjugados e o ácido colestático ( $3\beta$  hidroxi  $5\Delta$  colenônico) são colestáticos e os ácidos biliares menos hidroxilados, como o ácido quenodeoxicólico, são hepatotóxicos, enquanto que os hidrofílicos como o ácido cólico e o ursodeoxicólico protegem os hepatócitos da ação tóxica dos primeiros (SCHOLMERICH et al., 1990; BENZ et al., 1998; STIEHL et al., 1999). O potencial tóxico dos ácidos biliares em ordem decrescente e

colerético em ordem crescente é: ácido litocólico > deoxicólico > quenodeoxicólico > cólico > ursodeoxicólico.

Na ocorrência de doença hepática colestática as alterações a seguir podem ser observadas, em cortes histológicos de fígado por meio de microscopia óptica.

1. Colestase pura: presença de pigmentos biliares no citoplasma dos hepatócitos e das células de Küpffer, além de trombos biliares nos canalículos biliares, não havendo sinais de processo inflamatório ou degenerativo.

2. Necrose ou degeneração vacuolar dos hepatócitos, chamada "degeneração vacuolar" ou "plumosa".

3. Apoptose dos hepatócitos, desencadeada por ação dos ácidos biliares sobre receptores de morte celular na superfície do hepatócito. Os corpúsculos apoptóticos formados aparecem semelhantes aos de Councilman - as células se apresentam com volume diminuído, citoplasma denso e eosinofílico os núcleos, picnóticos ou fragmentados (JAESCHKE et al., 2002).

4. Fibrose: deposição de tecido conjuntivo fibrilar, nos espaços de Disse, secundária à degeneração celular, inflamação e proliferação ductal (MATHEW et al., 1994).

5. Cirrose biliar: caracterizada pela presença de faixas fibróticas envolvendo nódulos regenerativos (PHILLIPS et al., 1986).

6. Proliferação ductal: aparecem nos espaços-porta numerosos ductos biliares; a proliferação ductal parece ser secundária à destruição das células ductais pela ação tóxica dos ácidos biliares (PINZANI & MILANI, 1998).

7. Formação de células gigantes multinucleares: parece ser uma tentativa de regeneração dos hepatócitos, porém é observada quase que exclusivamente nos primeiros meses de vida.

## **1.9. MODELOS DE COLESTASE**

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

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

- 1) obstrução aguda e completa do ducto biliar comum (CAMERON & OAKLEY, 1932);
- 2) uso de endotoxinas (ARRESE et al., 2001);
- 3) uso de estinilestradiol (ARRESE et al., 2001);
- 4) uso de clorpromazina (AKERBOOM et al., 1991);

**5)** produção de imunodeficiência (COHEN & SIEGEL, 1993);

**6)** timectomia em camundongos (KOBASHI et al., 1994).

A ligadura e ressecção do ducto biliar comum em ratos é o método mais utilizado para o estudo experimental da colestase obstrutiva. Nesse modelo experimental, as seguintes lesões ocorrem: proliferação dos ductos biliares em intensidade muito maior do que aquela vista em humanos (GREIM et al., 1972), fibrose, especialmente em torno dos ductos biliares proliferados, infiltrado inflamatório discreto e formação de cirrose septal parcial. Ocorrem também disfunção mitocondrial, ruptura das estruturas da junção firme e redistribuição das proteínas das membranas, invertendo a polaridade dos hepatócitos (BOSSARD et al., 1993; BOLDER et al., 1997; LEE et al., 2001., BARR & HUBBARD, 1993). Alterações do metabolismo de vitaminas lipossolúveis da colestase também têm sido estudadas por esse modelo (DEVRIESE et al., 2001).

A idade do animal ao ser submetido à ligadura do ducto biliar comum parece ser importante para obter um modelo mais próximo à doença humana, ou seja, com formação de cirrose biliar secundária. Cameron e Oakley (1932) mostraram que a ligadura do colédoco em ratos de 80 a 300 gramas (aproximadamente de 30 a 80 dias de vida) produz numa fase tardia (61 dias após a ligadura), uma grande proliferação ductal, simulando um processo adenomatoso, porém sem características

de cirrose hepática. A fibrose, nesse caso foi atribuída a inflamação secundária. Usando ratos mais jovens (12 dias de vida) Medeiros e colaboradores (1988) mostraram que a lesão hepática se aproxima mais da cirrose biliar, sem ocorrer infecção secundária. O mesmo foi encontrado por Caramori (2000) em ratos de 21 dias sacrificados aos 49 dias de vida.

## **1.10. ESTRESSE OXIDATIVO E VITAMINA E**

Na maioria das doenças humanas há formação aumentada de radicais livres, secundária ao processo da doença primária, agravando-as. Existem razoáveis evidências de que reações de radicais livres resultam em contribuição significativa aos processos patológicos: envelhecimento, carcinogênese, aterosclerose, artrite reumatóide, algumas formas de desconforto respiratório agudo e dano isquêmico ou traumático do sistema nervoso central (HALLIWELL, 1991). Vários estudos vêm demonstrando a correlação positiva entre a colestase crônica e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) (KRAHENBUHL et al., 1995).

Os radicais livres são potencialmente tóxicos, tendo como alvos principais as proteínas, os lipídios insaturados e os ácidos nucléicos, com os quais formam ligações covalentes irreversíveis, levando à inativação ou destruição de enzimas, causando peroxidação dos lipídios

insaturados das membranas celulares e liberando aldeídos tóxicos (JAKUS & LOPUCHOVA, 1999, SASTRE et al., 2006).

A produção de radicais livres se realiza através de várias reações em cadeia que, partindo de radicais pouco tóxicos, como o ânion superóxido  $O_2^{\bullet-}$ , leva à formação de radicais livres altamente reativos como  $OH^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ . Radicais peróxido e aldeídos citotóxicos resultantes da peroxidação de ácidos graxos insaturados podem também causar graves prejuízos nas proteínas das membranas incluindo seus receptores, enzimas associadas e proteínas transportadoras (SASTRE et al., 2006).

O organismo conta com mecanismos de equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (BAST et al., 1991). Existem enzimas que funcionam como bloqueadores da oxidação, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase, que eliminam os radicais livres ou previnem sua formação (HALLIWELL, 1991, JAKUS & LOPUCHOVA, 1999). Elas contêm metais, cobre, zinco, manganês, selênio e ferro (heme), que participam da reação de redução dos radicais livres. As defesas antioxidantes também incluem moléculas que reagem diretamente com os radicais livres, dentre elas a bilirrubina ou quelantes de metais ionizados como a carmosina e creatinina, o ácido úrico e as vitaminas A, C e E (DELANGE & GLAZER, 1990).

Durante a colestase obstrutiva crônica os mecanismos de defesa contra radicais livres estão prejudicados (MACHLIN & BENDICH.,

1987, SINGH et al., 1992, PETERTON, 2006) tanto pelas lesões mitocondriais causadas por ácidos biliares quanto pela falta de fatores antioxidantes (TAPPEL, 1968; BURTON et al., 1983; SINGH et al., 1992; SCHIMPL et al., 2000), como a vitamina A e E e pela má absorção (SINGH et al., 1992; FURST, 1997; FLOREANI et al., 2000).

A vitamina E é considerada um fator protetor contra diversas enfermidades, incluindo a cirrose decorrente da colestase obstrutiva crônica, devido a sua ação fundamental como agente antioxidante que protege os ácidos graxos poliinsaturados das membranas da peroxidação lipídica, mantendo, desta forma, a integridade da membrana celular (OHTA, 2006).

Há longo tempo, vem-se demonstrando a efetividade da suplementação com vitamina E injetável durante a colestase obstrutiva crônica. Os resultados mostraram uma diminuição significativa da produção de radicais livres e conseqüente diminuição da agressão à membrana celular em cultura de hepatócitos (SOKOL et al., 1993).

Ortiz (2003), analisou a suplementação oral de vitamina E em ratos submetidos a ligadura e ressecção do ducto biliar comum e observou que embora a suplementação oral de vitamina E lipossolúvel parece segura não foi evidenciado nenhum efeito benéfico desta forma de administração. Da mesma forma, Prince (2003) não encontrou efeitos benéficos na suplementação por via oral de vitamina E sobre a fadiga associada a cirrose biliar primária em humanos.

Muriel e Moreno (2004), mostraram que a suplementação com vitamina E lipossolúvel durante a colestase obstrutiva, produzida por ligadura e ressecção do ducto biliar, é mais efetiva pela via parenteral, visto que na presença de colestase ocorre ausência de absorção das vitaminas lipossolúveis.

A deficiência de vitamina E é um fato bem estabelecido na colestase extra-hepática prolongada. Apesar dos avanços na terapêutica, essa complicação continua de difícil solução, principalmente, quando a suplementação se faz por via oral.

Visto a dificuldade da suplementação e a pouca eficácia da vitamina E lipossolúvel, administrada por via oral, demonstrada em pacientes e em estudos experimentais de cirrose crônica, decorrente da colestase extra-hepática, tem-se utilizado nas últimas décadas uma forma de vitamina E hidromiscível (TPGS – *d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate* – succinato de d-alfa-tocoferol polietilino glicol 1000). A vitamina E-TPGS não necessita da presença de ácidos biliares e de enzimas pancreáticas para sua completa absorção (TRABER et al., 1986, TRABER et al., 1990, TRABER et al., 1994). Esta forma hidromiscível de vitamina E está relacionada com aumento da biodisponibilidade de drogas lipossolúveis nos casos em que há dificuldade na sua absorção, especialmente em pacientes que possuem função hepática e pancreática comprometida. (ARGAO et al., 1992). Portanto, a vitamina E-TPGS pode ser uma fonte aproveitável para indivíduos com doenças específicas, nas quais ocorre síndrome de má absorção (SOKOL et al., 1987).

A vitamina E-TPGS é uma vitamina hidromiscível derivada de uma fonte natural. Sua preparação consiste na esterificação do grupo ácido dos cristais do ácido succínico ao *d-alfa-tocoperol ligado ao polietilen glicol 1000*. Estruturalmente é composta de duas porções, uma lipofílica e outra hidrofílica. As suas propriedades químicas indicam sua utilização em forma de: **1)** emulsão; **2)** solução; ou como **3)** intensificador de absorção e **4)** fonte de vitamina E.

Sokol e colaboradores (1987), compararam, em crianças com colestase, a administração via oral de vitamina E lipossolúvel em doses maciças (100 a 200UI/kg/dia) com a administração de vitamina E-TPGS – hidromiscível em doses bem menores (15 a 25UI/Kg/dia). Os resultados mostraram que a vitamina E-TPGS pode normalizar e corrigir os níveis séricos de vitamina E em crianças durante a colestase crônica, ao contrário da vitamina E lipossolúvel.

Socha e colaboradores (1997), observaram que a suplementação com a vitamina E-TPGS em doses similares ao estudo de Sokol (20U/Kg/dia) durante um mês, em crianças com colestase crônica, normalizou, os níveis séricos de vitamina E.

No entanto, não encontramos na literatura nenhum estudo clínico ou experimental sobre os efeitos da suplementação de uma forma oral hidromiscível de vitamina E sobre as alterações nutricionais, a lesão e disfunção hepáticas da colestase obstrutiva crônica na infância. Portanto, propusemo-nos a estudar esses efeitos.

## **2.0. OBJETIVOS**

Testar num modelo experimental de colestase obstrutiva do lactente as seguintes hipóteses;

**1) Primeira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações nutricionais decorrentes da colestase

**2) Segunda Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações do metabolismo lipídico na colestase

**3) Terceira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as lesões hepáticas decorrentes da colestase

### **3.0. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

1) **Primeira Hipótese**: A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações nutricionais decorrentes da colestase

#### **VARIÁVEIS INDEPENDENTES**

- Presença ou não de colestase (operação simulada ou ligadura com ressecção do ducto biliar comum)
- Administração ou não de uma forma hidromiscível de vitamina E

#### **VARIÁVEIS DEPENDENTES**

##### ❖ ***Indicadores Nutricionais***

- Ração ingerida, aproveitamento nutricional, ganho de peso, conteúdo de nitrogênio da carcaça, balanço nitrogenado e conteúdo de água e gordura da carcaça.

**2)Segunda Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações do metabolismo lipídico na colestase

### **VARIÁVEIS INDEPENDENTES**

- Presença ou não de colestase (operação simulada ou ligadura com ressecção do ducto biliar comum)
- Administração ou não de uma forma hidromiscível de vitamina E

### **VARIÁVEIS DEPENDENTES**

#### **❖ *Metabolismo lipídico***

- Concentrações séricas de: colesterol total, triacilgliceróis, lipoproteína de alta densidade - colesterol (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade - colesterol (LDL-c), lipoproteína de muito baixa densidade - colesterol (VLDL-c).

**3)Terceira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as lesões hepáticas decorrentes da colestase

### **VARIÁVEIS INDEPENDENTES**

- Presença ou não de colestase (operação simulada ou ligadura com ressecção do ducto biliar comum)
- Administração ou não de uma forma hidromiscível de vitamina E

### **VARIÁVEIS DEPENDENTES**

#### ❖ ***Função hepática***

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

#### ❖ ***Lesão hepática***

- Atividades séricas de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT)
- Concentração sérica de globulinas, de vitamina A e E.
- Peso fresco, conteúdo de água e de gordura do fígado e do baço
- Alterações histológicas (intensidade de fibrose, número de áreas de necrose, intensidade de proliferação ductal, intensidade de esteatose e de degeneração hidrópica, e frequência de mitoses)

### 3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

#### QUADRO 3 – Grupos experimentais

- 
- **Grupo SA**– operação simulada com administração diária, por gavagem, num volume de 0,02 ml de água por grama de peso do animal
  - **Grupo SE** – operação simulada com administração diária, por gavagem, de 25UI/kg num volume de 0,02ml de vitamina E-TPGS por grama de peso do animal de uma solução a 20% de TPGS
  - **Grupo LA** – Ligadura e ressecção do ducto biliar comum e administração diária, por gavagem, num volume de 0,02ml de água por grama de peso do animal.
  - **Grupo LE** – Ligadura e ressecção do ducto biliar comum e administração diária, por gavagem, de 25UI/kg num volume de 0,02ml de vitamina E-TPGS por grama de peso do animal de uma solução a 20% de TPGS
-

### 3.3. DESCRIÇÃO E PREPARO DA FORMA HIDROMISCÍVEL DE VITAMINA E – TPGS

A vitamina E-TPGS foi fornecida pelo laboratório *Eastman Chemical Company*<sup>®</sup>

#### 3.3.1. PROPRIEDADES DA SOLUÇÃO

As propriedades fundamentais e as características químicas da vitamina E-TPGS estão descritas na tabela a seguir:

**TABELA 1** – Características químicas da vitamina E-TPGS

▪ Conteúdo mínimo de vitamina E (mg/g)	260 como d-alfa-tocoferol
▪ Peso molecular	1,513
▪ Forma física	Cera sólida
▪ Cor	Amarelo pálido
▪ Potencia (UI/g)	387
▪ Valor ácido máximo	1,5
▪ Gravidade específica a (45°C)	1,06
▪ Solubilidade em água	Miscível em todas as partes
▪ HLB (balanço hidrofílico/lipofílico)	15 -19
▪ Estabilidade	Estável ao ar e reativo com álcalis

Fonte: *Eastman, 2005*

### 3.3.2. PROPRIEDADES TÉRMICAS

Em experimento conduzido, pelo laboratório *Eastman*, para determinar o ponto de fusão do TPGS foram observados valores variáveis desde 41 a 38°C, essas diferenças foram encontradas devido a sucessivos ciclos de aquecimento e resfriamento. Depois de 19 ciclos o ponto de fusão diminuiu em 3°C passando de 41 para 38. Esses resultados mostram que o TPGS é termicamente estável durante transições repetitivas da fase líquida para fase sólida e vice e versa.

Num segundo experimento foi estudada a degradação térmica do TPGS a qual ocorre a 199,3°C. A alta temperatura de degradação indica uma excelente estabilidade térmica do TPGS sob processos térmicos normais utilizados pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. O TPGS é estável sob as condições de calor de esterilização (125°C) (*Eastman, 2005*).

### 3.3.3. PROPRIEDADES SOLÚVEIS E PREPARO DA DISSOLUÇÃO

O TPGS é miscível em água e em soluções a base de água nas concentrações de até 20%, que pode ser utilizada como uma forma de suplementação de vitamina. Em concentrações superiores a 20% podem formar cristais líquidos, e aumentar a viscosidade, dificultando, desta forma, sua administração. A viscosidade do TPGS é constante dentro dos seguintes valores – concentrações até 20%, temperaturas de 20 a 45°C (*Eastman, 2005*).

Em nosso experimento, para a total dissolução da vitamina E-TPGS, seguiu-se os seguintes passos:

### **1. Fusão da vitamina E-TPGS**

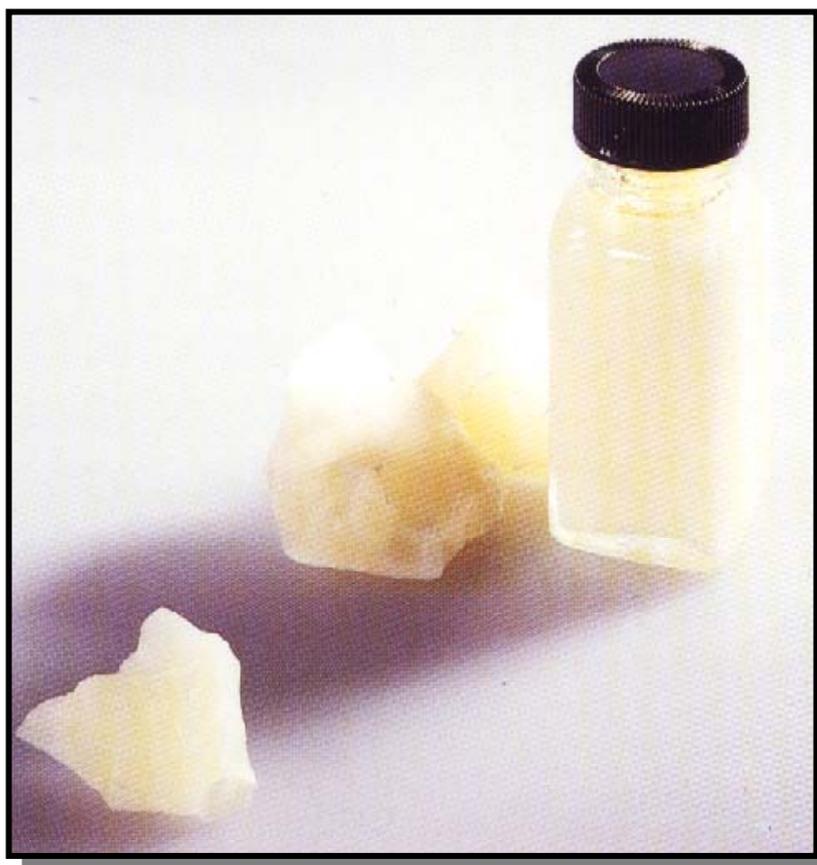
A vitamina E-TPGS foi dissolvida em banho-maria a temperatura constante de 41°C até completa fusão.

### **2. Dissolução da vitamina E-TPGS**

Posteriormente a vitamina E-TPGS já no seu estado líquido foi adicionada vagorosamente à um Becker com água a temperatura perto do ponto de ebulição e misturado vigorosamente, para formar uma solução a 20% de TPGS

### **3. Homogeneização e armazenamento da vitamina E-TPGS**

A solução foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente até a completa dissolução das partículas de gel, formadas no passo anterior, e obtido como resultado final uma mistura homogênea pronta para a administração. O homogeneizado foi armazenado em vidros de cor âmbar de 20ml, conservados em geladeira a -4°C para o uso dentro de um período de 10 dias. Os passos citados foram repetidos todas as vezes que houve necessidade de mais vitamina E-TPGS.



**Figura 1** – Vitamina E – TPGS

### 3.4. COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO

Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração padronizada e preparada pelo Laboratório Experimental do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp. A composição da ração encontra-se na tabela 2 e a mistura vitamínica na tabela 3.

**TABELA 2** – Composição da ração

COMPONENTES DA DIETA	g/kg
Proteína (caseína 18%)	1,8
Mistura salina (LAJOLO et al., 1969, FOX & BRIGGS, 1960)	0,4
Fibra (sabugo de milho)	0,4
Mistura vitamínica (LAJOLO et al., 1969)	0,1
Benzoato de sódio	0,01
Óleo de milho	0,8
Sacarose	1,0
Amido de milho (Maizena) <sup>®</sup>	5,49

**TABELA 3 – Mistura Vitamínica**

<b>VITAMINA</b>	<b>em 1000g</b>
Tiamina (vit. B1)	0.50g
Riboflavina (vit. B2)	0.003g
Piridoxina (vit. B6)	0.50g
Cianocobalamina (vit. B12)	3mg
Colina	200g
Ácido Ascórbico	100g
Ácido para amino benzóico – PABA	10g
Niacina	5g
Retinol (vit. A)	0.15g
Ergocalciferol (vit.D)	0.125g
Tocoferol acetato (vit. E)	5g
Menadiona (vit. K)	5g
Pantotenato de cálcio	2g
Ácido fólico	0,2g
Biotina	0,03g
Inositol	100g
Sacarose	574,192g

(LAJOLO et al., 1969)

### 3.5. EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA – Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp, protocolo nº 147, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996). Todos os cuidados com manutenção dos animais, procedimento anestésico, cirurgia e sacrifício foram executados segundo recomendações contidas no guia do *Canadian Council of Animal Care* (CCAC, 1984) e no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – USA, 1996).

#### 3.5.1. ACASALAMENTO E DIAGNÓSTICO DE PREENHIZ

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

o diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Assim, este dia foi considerado como o dia 0 (zero) da gestação.

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

### **3.5.2. CUIDADOS E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

Todos os animais, desde o nascimento até a ligadura ou operação simulada, ou seja, até o P21, foram amamentados pela própria mãe em grupos de 6. Enquanto eram amamentados, não tinham acesso à dieta fornecida para a mãe, pois as gaiolas tinham o fundo com grade, impedindo-os de comerem restos de ração, e a ração ficava no alto da gaiola, inacessível aos ratos pequenos. Foram mantidos em condições ambientais controladas – a temperatura foi mantida em torno de 22 a 23°C e a luz em ciclos de 12 horas alternando entre claro e escuro. Após o desmame, feito no P21, até a eutanásia, no P49, foram mantidos em gaiolas individuais, como citado anteriormente, com acesso *ad libitum* à água e a ração padronizada conforme a distribuição pelos grupos, como descrito anteriormente.

## 3.6. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

### 3.6.1. LIGADURA E RESSECÇÃO DO DUCTO BILIAR COMUM

A ligadura e ressecção do ducto biliar comum foi realizada de acordo com a técnica adaptada pelo grupo de Hepatologia do Departamento de Pediatria da UNESP (BATTOCHIO et al., 2004), que consiste nos mesmos princípios descritos por CAMERON & OAKLEY (1932) com modificações. A técnica adaptada está apresentada no Quadro 4 e Figura 2.

#### Quadro 4 – Descrição da técnica cirúrgica adaptada.

##### **I. Manejo do animal, noções de bioterismo, técnica anestésica.**

- Ia.** Peso do animal utilizando-se a balança digital Mettler Toledo (mod. PB3002, peso máx. = 3,100g, peso mín. = 0,5g, sensibilidade de 0,1g).
- Ib.** Anestesia intraperitoneal com pentobarbital dose de 30mg/kg (concentração de 3g/100ml solução e administração de 0,001ml/g de peso do animal).
- Ic.** Posicionamento dos animais em decúbito dorsal horizontal na mesa operatória.

##### **II. Técnica da abordagem abdominal.**

- Ila.** Tricotomia da parede abdominal anterior.
- Ilb.** Incisão da pele na linha mediana de aproximadamente 1 cm (foto A).
- Ilc.** Exposição das camadas musculares e a linha Alba.
- Ild.** Incisão da linha Alba do mesmo tamanho da abertura da pele.
- Ile.** Abertura do peritônio com tesoura reta sem a exposição dos órgãos abdominais, seguindo diretamente para a exposição do ducto biliar comum com abaixamento do duodeno, a partir da localização do fígado (foto B).

**Quadro 4 – Continuação**

---

**III. Abordagem, dissecação e ressecção do ducto biliar.**

**IIIa.** Dissecação do ducto biliar comum desde abaixo da entrada do último ducto biliar até sua porção distal, próxima ao duodeno.

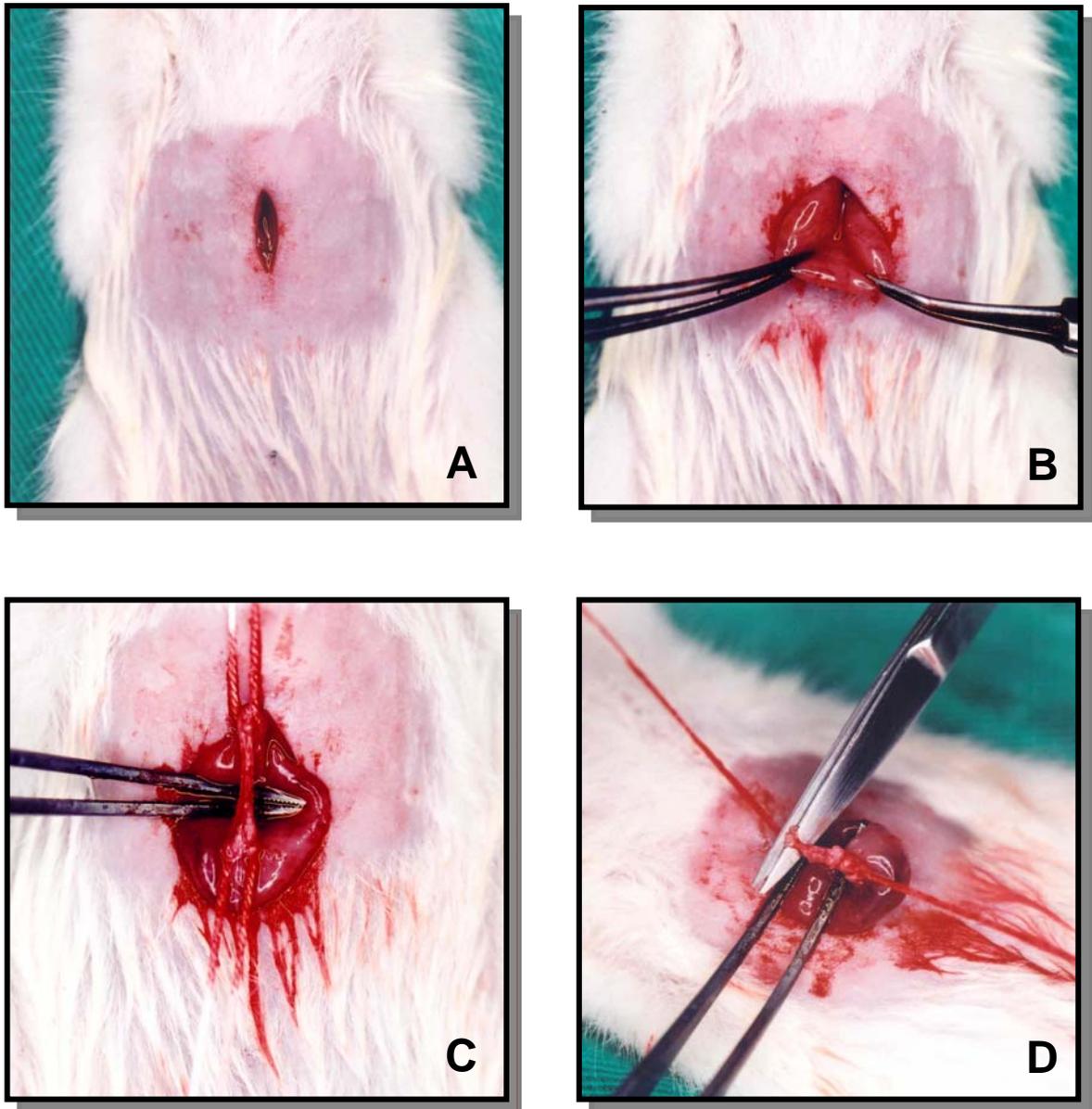
**IIIb.** Dupla ligadura do ducto biliar comum, sendo colocadas as ligaduras o mais proximal e o mais distalmente possível (foto C).

**IIIc.** Ressecção da porção do ducto biliar comum entre as duas ligaduras (foto D).

**IIId.** Fechamento da parede abdominal com sutura contínua.

---

(BATTOCHIO et al., 2004)



**Figura 2** – Demonstração do procedimento cirúrgico da ligadura e ressecção do ducto biliar comum realizado segundo a técnica adaptada. **A)** Tricotomia da parede abdominal e abertura do peritônio; **B)** Exposição do ducto biliar comum com abaixamento do duodeno, a partir da localização do fígado; **C)** Dupla ligadura do ducto biliar comum; **D)** Ressecção da porção do ducto biliar comum entre as duas ligaduras.

### **3.6.2. OPERAÇÃO SIMULADA**

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

## **3.7. OBSERVAÇÕES E MEDIDAS REALIZADAS DURANTE O EXPERIMENTO**

### **3.7.1. GANHO DE PESO**

Os animais foram pesados no P21 e no 49º dia pós-natal (P49) em balança semi-analítica Mettler Toledo (modelo PB 3002, peso máximo = 3.100g, peso mínimo = 0,5g, sensibilidade de 0,1g) e o ganho de peso foi obtido pela diferença entre o peso P49 e o do P21.

### **3.7.2. RAÇÃO INGERIDA**

A quantidade de ração ingerida, em gramas, foi determinada diariamente pela diferença entre o peso da ração oferecida (g) e o peso da ração rejeitada, do P21 ao P49. A ração foi pesada em balança semi-analítica Mettler Toledo (modelo PB 3002, peso máximo = 3.100g, peso mínimo = 0,5g, sensibilidade de 0,1g).

### 3.7.3. APROVEITAMENTO NUTRICIONAL

O aproveitamento nutricional foi obtido através da divisão do ganho de peso do P21 ao P49, pela quantidade de ração ingerida em gramas do P21 ao P49.

<b>Aproveitamento Nutricional</b>	Ganho de peso (g)
	Ração ingerida (g)

### 3.7.4. TEMPO DE SONO APÓS PENTOBARBITAL

O teste do tempo de sono foi realizado no P48, por injeção intraperitoneal com pentobarbital na dose de 50mg/kg (concentração de 3g/100ml de solução e administração de 0,0017ml/peso do animal). Foi medido o tempo, em minutos, desde a perda do reflexo de posição até a recuperação do mesmo (LUTZ & WAGNER, 1984).

## 3.8. TÉCNICA UTILIZADA NA EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada no P49, após anestesia intraperitoneal com pentobarbital, na dose de 50mg/kg (concentração de 3g/100ml de solução e administração de 0,0017ml/peso do animal), por exsanguinação através de punção cardíaca. O sangue foi colhido neste momento para a realização dos exames bioquímicos séricos.

## **3.9. MEDIDAS REALIZADAS APÓS A EUTANÁSIA**

### **3.9.1. EXAMES BIOQUÍMICOS**

A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, com separação do soro, que foi conservado congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

#### **3.9.1.1. Dosagem sérica de AST e ALT**

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

#### **3.9.1.2. Dosagem sérica de proteínas e frações, triacilgliceróis, colesterol total e frações**

As dosagens de proteínas totais e frações, colesterol total, triacilgliceróis e HDL foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico, por automação, no aparelho Technicon®, modelo RAXT. Os valores foram expressos em gramas por decilitro (g/dL). Os valores de VLDL e LDL foram obtidos por meio de cálculos a partir dos resultados encontrados para triacilgliceróis, colesterol total e HDL, através das seguintes fórmulas:

$$VLDL = \frac{\text{Triacilgliceróis}}{5}$$
$$LDL = \text{Coolesterol total} - \text{HDL} - \text{VLDL}$$

### 3.9.1.3. Dosagem sérica das vitaminas lipossolúveis A e E

Para extração das vitaminas lipossolúveis foi utilizada a técnica de extração descrita por ARNAULD et al, 1991 modificada, aumentando a sua sensibilidade.

Para determinação da concentração de vitaminas lipossolúveis foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta pressão, (*high pressure liquid chromatography- HPLC*), em aparelho da marca VARIAN. A fase móvel utilizada neste método é uma solução de 70% (v/v) de acetonitrila, 20% (v/v) de diclorometano e 10% (v/v) de metanol. Foi utilizada a coluna C18 para HPLC da marca VARIAN especialmente projetada para a separação de vitaminas. Seu diâmetro é de 4,6mm, seu comprimento de 25cm e o diâmetro de suas partículas é de 5 $\mu$ m. O fluxo utilizado foi de 1,2ml/minuto.

Foi elaborado um padrão interno para solução de etanol (HPLC) no qual foi utilizado 75 $\mu$ M/L de  $\alpha$ -tocofherol e 12,2 $\mu$ M/L de palmitato.

### 3.9.2. DOSAGEM DE NITROGÊNIO DA CARÇAÇA, FEZES, URINA E BALANÇO NITROGENADO (BN)

A dosagem de nitrogênio da carcaça, fezes e urina foi realizada segundo o método micro-Kjeldahl (KJELDAHL, 1965).

O balanço nitrogenado foi calculado subtraindo-se a quantidade eliminada da quantidade ingerida na última semana do experimento (do P42 ao P49).

A quantidade de nitrogênio ingerida foi calculada considerando que 1g de nitrogênio correspondente a 6,25g de proteína. O peso das fezes e o volume de urina foram anotados no final da coleta e as amostras mantidas sob refrigeração até a dosagem de nitrogênio.

$$\text{Balanço Nitrogenado} = N_2 \text{ ingestão} - N_2 \text{ fezes} - N_2 \text{ urina}$$

Para a dosagem de nitrogênio das fezes, foram seguidos os seguintes passos:

- 1) determinação do peso fresco balança de torção Nagma graduada em 0,1g;
- 2) desidratação em estufa a 100°C por 48 horas;
- 3) determinação do peso seco na mesma balança;
- 4) o conteúdo desidratado foi triturado para realização da dosagem de nitrogênio.

### 3.9.3. ANÁLISE DOS ÓRGÃOS

#### 3.9.3.1. Peso fresco dos órgãos e da carcaça

O peso dos órgãos (fígado e baço) foi determinado em balança analítica Mettler (modelo H35; d=0,1g; peso máximo=160g). A carcaça foi pesada em balança semi-analítica mencionada anteriormente. Os pesos foram expressos em gramas. Após pesagem, foi retirado um fragmento longitudinal do lobo direito do fígado para análise histológica (ver item 3.9.4). Foi determinado o peso do fígado e do baço relativo ao peso do animal (g/100g de peso do animal) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo do órgão} = \frac{\text{Peso do órgão (g)} \times 100}{\text{Peso do animal (g)}}$$

#### 3.9.3.2 Conteúdo de água dos órgãos e da carcaça

O conteúdo de água dos órgãos (fígado e baço) e da carcaça foi determinado por métodos gravimétricos, descritos a seguir:

- 1) Determinação do peso fresco dos órgãos (após retirada do fragmento para análise histológica) em balança analítica Mettler;
- 2) Desidratação em estufa a 100°C por 48 horas;
- 3) Determinação do peso seco na mesma balança utilizada para determinar o peso fresco;
- 4) Cálculo do conteúdo de água em g/100g de peso do animal.

$$\text{Conteúdo de água} = \frac{\text{Teor de água} \times \text{Peso do órgão (g)}}{\text{Peso do animal (g)}} \\ \text{(g de água/100g de tecido)}$$

### 3.9.3.3 Conteúdo de gordura dos órgãos e da carcaça

O conteúdo de gordura dos órgãos (fígado e baço) e da carcaça foi determinado por métodos gravimétricos. Após a secagem, uma porção dos órgãos e a carcaça foram trituradas em graal, e foi submetida aos mesmos procedimentos que os órgãos descritos a seguir:

- 1) Pesagem do material desidratado obtido como descrito acima;
- 2) Extração da gordura do material envolto em papel de filtro por éter sulfúrico no extrator de Soxhlet por um período de 12 horas;
- 3) Evaporação do material em ar ambiente por um período de 24 horas;
- 4) Nova passagem em estufa a 100°C por 1 hora;
- 5) Pesagem do material sem gordura;
- 6) Cálculo do conteúdo de gordura em g/100g de peso do animal.

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

### 3.9.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

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

As lâminas de todos os grupos foram analisadas individualmente, de maneira aleatória sem o conhecimento dos grupos à que pertencia o material observado. Toda a extensão da secção do fígado de cada animal foi analisada e a intensidade das alterações foram mensuradas por um método semi-quantitativo: degeneração hidrópica, esteatose, proliferação ductal, fibrose e inflamação. As áreas de necrose foram contadas em 10 campos de médio aumento (10x) e as mitoses foram contadas em 20 campos de grande aumento (40x).

## **3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

### **3.10.1. MÉTODOS ESTATÍSTICOS DESCRITIVOS**

Para as variáveis relacionadas aos exames bioquímicos, às análises dos órgãos, ao tempo de sono após pentobarbital e às medidas histológicas foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (valores extremos, amplitude de variação, distância interquartís, desvio padrão e coeficiente de variação) de cada grupo experimental.

### **3.10.2. MÉTODOS ESTATÍSTICOS COMPARATIVOS**

Os valores das variáveis de cada grupo experimental foram comparadas entre si, utilizando o programa Sigma Stat for Windows<sup>®</sup> 3,5, Jandel Corporation, conforme as etapas apresentadas a seguir.

**1)** Verificação da normalidade e da igualdade de variâncias dos valores obtidos para cada grupo.

**2)** Caso essas condições fossem satisfeitas, foi aplicada análise de variância para dois fatores, sendo: o fator 1 a presença (dupla ligadura e ressecção do ducto biliar comum) ou ausência de colestase (operação simulada); e o fator 2 a administração ou não da vitamina E-TPGS. Dessa forma, foram testados os efeitos de cada fator, independentemente do efeito do outro, bem como a interação dos dois fatores.

**3)** Havendo interação significativa entre os fatores (p do  $\alpha \leq 0,05$ ), foram realizadas comparações múltiplas pareadas pelo método de Student-Newman-Keuls (S.N.K), identificando os pares de grupos com diferença significativas entre si (p do  $\alpha \leq 0,05$ );

**4)** No caso de não serem satisfeitos os critérios do item 1, foram feitas transformações matemáticas, sendo escolhida aquela que satisfizesse os critérios de normalidade e igualdade de variância. As transformações matemáticas testadas foram feitas através da substituição de cada medida por valor absoluto, logaritmo neperiano, logaritmo de base 10, potência quadrada, recíproca, exponencial, raiz quadrada, arco-seno da raiz quadrada e ordenação em postos, sendo escolhida aquela que satisfizesse os critérios de normalidade e igualdade de variância. Este foi o caso da quantidade de ração ingerida (rank), do ganho de peso (rank), do conteúdo de água e gordura da carcaça (rank), do peso fresco, conteúdo de água e de gordura do fígado (rank), do peso fresco do baço (rank), da atividade sérica da AST (rank), do tempo de sono após pentobarbital (ln), dos níveis séricos de albumina (rank), dos níveis séricos de globulinas (sqr), dos níveis séricos de colesterol-total (log10), dos níveis séricos de LDL-c (sqr), dos níveis séricos de VLDL-c (log10), da intensidade de esteatose (rank) e de inflamação (rank).

Os gráficos tipo *point and columins* mostram as médias (pontos cheios), os desvios-padrão para cima ou para baixo da média (linha) e os valores individuais (pontos vazios) das medidas realizadas em

cada grupo experimental ou de suas transformações ou as médias dos grupos segundo os tratamentos ou segundo a administração ou não de vitamina E.

Os gráficos de linha com marcadores mostram comparações entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (ligadura ou operação simulada) e administração (administração ou não de vitamina E-TPGS), e as diferenças significativas entre os grupos pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

#### **4.0. RESULTADOS**

Os resultados das análises estatísticas para as variáveis estudadas estão apresentados segundo as hipóteses e estão na seguinte ordem:

**1) Primeira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações nutricionais decorrentes da colestase

Ração ingerida	Tabela 4, figura 3 e 4 – página 62
Aproveitamento nutricional	Tabela 5, figura 5 e 6 – página 63
Conteúdo de nitrogênio da carcaça	Tabela 6, figura 7 e 8 – página 64
Balanço nitrogenado	Tabela 7, figura 9 e 10 – página 65
Ganho de peso	Tabela 8, figura 11 e 12 – página 66
Peso fresco da carcaça	Tabela 9, figura 13 e 14 – página 67
Conteúdo de água da carcaça	Tabela 10, figura 15 e 16 – página 68
Conteúdo de gordura da carcaça	Tabela 11, figura 17 e 18 – página 69
Tabela de resumo dos resultados	Tabela 12 – página 70

**Tabela 4: RAÇÃO INGERIDA (g)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	17,50	30,00	5,50	24,50
Máximo	38,00	40,00	30,00	39,00
Mínimo	7,00	10,00	1,00	12,00
AV	31,00	30,00	29,00	27,00
DI	21,00	11,00	8,00	8,00
Média	21,40	27,30	8,90	24,40
DP	11,75	9,20	8,19	8,40
CV (%)	54,91	33,70	92,02	34,43

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

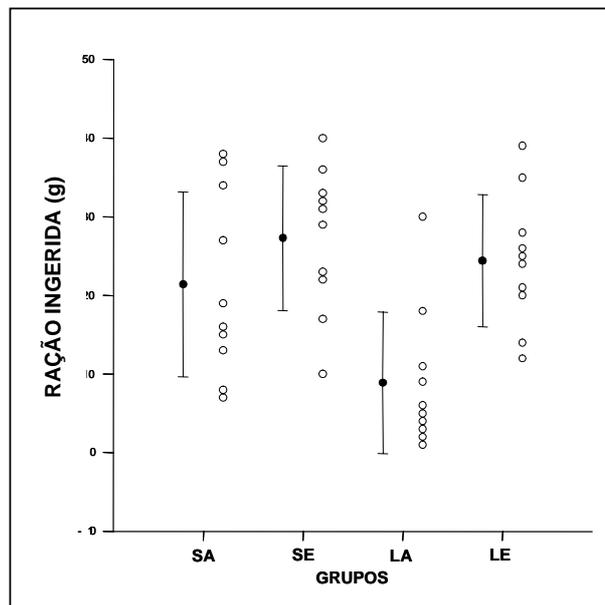
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 3 e 4)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

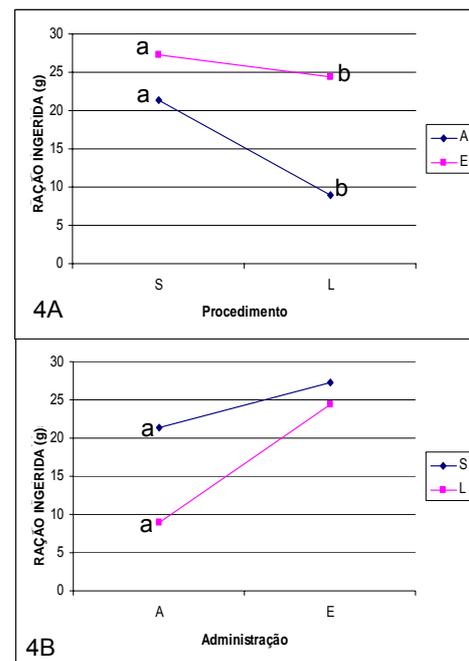
(LA + LE) < (SA + SE)  $p = 0,016$  ∴ *significativa*

(LA + SA) < (LE + SE)  $p = 0,001$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,125$  ∴ *não significativa*



**Figura 3 – Ração ingerida** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 4 – Ração ingerida** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu a quantidade de ração ingerida, independentemente da administração de vitamina E-TPGS. A vitamina E-TPGS aumentou a quantidade de ração ingerida, independentemente da colestase. Não interação entre a administração de vitamina e colestase.

**Tabela 5: APROVEITAMENTO NUTRICIONAL (g)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,36	0,37	0,13	0,37
Máximo	0,43	0,53	0,30	0,43
Mínimo	0,31	0,34	0,08	0,26
AV	0,12	0,19	0,22	0,17
DI	9,00	7,00	15,00	0,00
Média	0,36	0,39	0,21	0,37
DP	0,05	0,06	0,08	0,05
CV (%)	13,90	15,40	38,10	15,50

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 5 e 6)

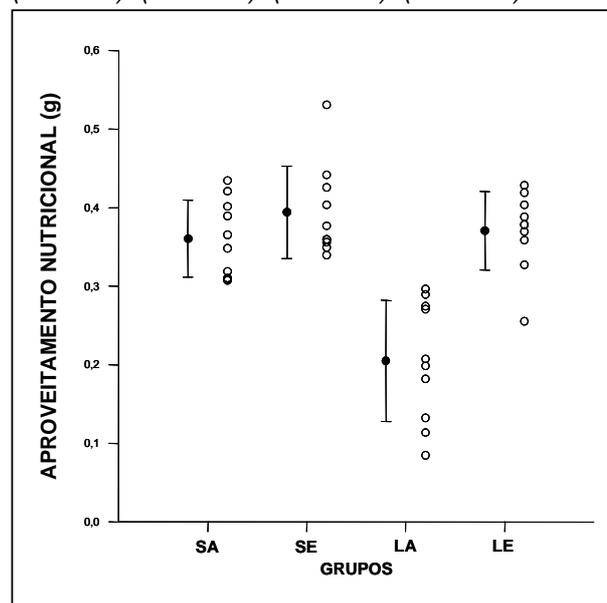
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

$(LA + LE) < (SA + SE)$   $p = <0,001$  ∴ *significativa*

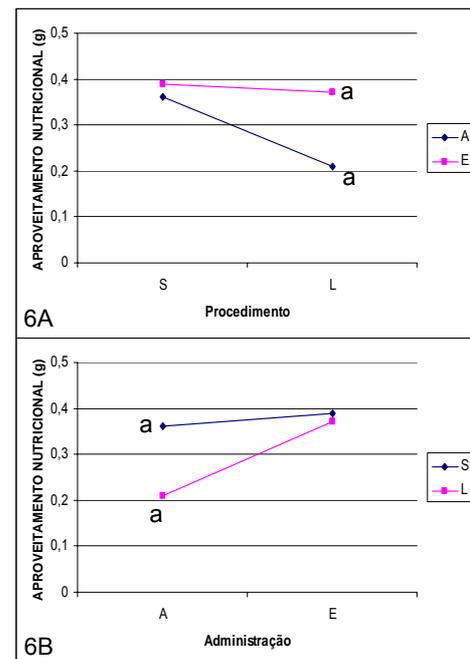
$(LA + SA) < (LE + SE)$   $p = <0,001$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,001$  ∴ *significativa*

$(LA < LE) / (LA < SA) / (LE \approx SE) / (SA \approx SE)$



**Figura 5 – Aproveitamento nutricional** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 6 – Aproveitamento nutricional** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu o aproveitamento nutricional. A vitamina E-TPGS corrigiu a diminuição do aproveitamento nutricional causada pela colestase.

**Tabela 6: CONTEÚDO DE NITROGENIO DA CARÇAÇA (g/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
Mediana	11,16	24,56	12,07	21,93
Máximo	13,18	28,78	15,65	24,69
Mínimo	9,33	20,01	8,98	19,16
AV	3,85	8,77	6,67	5,53
DI	1,75	4,31	3,96	2,53
Média	11,06	24,16	12,32	21,66
DP)	1,2	2,76	2,3	1,68
CV (%)	10,84	11,42	18,67	7,76

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 7 e 8)

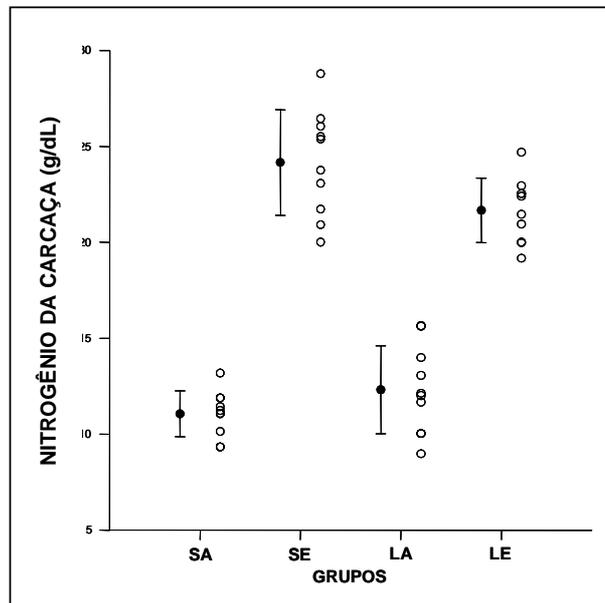
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE)  $\approx$  (SA + SE)  $p = 0,351$   $\therefore$  não significativa

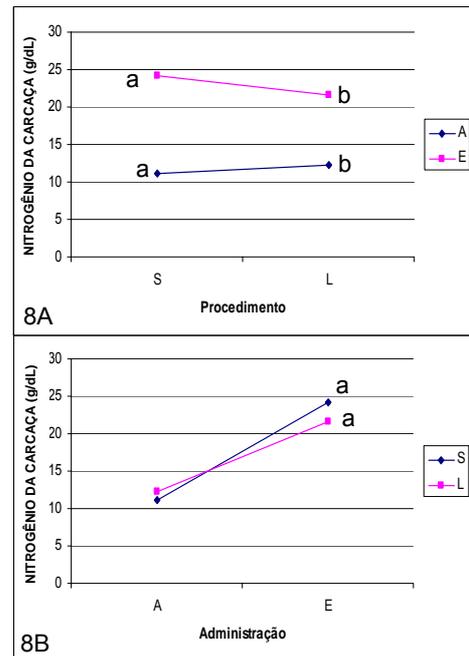
(LA + SA) < (LE + SE)  $p = <0,001$   $\therefore$  significativa

\*Interação  $p = 0,007$   $\therefore$  significativa

SNK – (LA < LE)/ (LA  $\approx$  SA)/ (LE < SE)/ (SA < SE)



**Figura 7 – Conteúdo de nitrogênio da carcaça –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 8 – Conteúdo de nitrogênio da carcaça –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A vitamina E-TPGS elevou o nitrogênio da carcaça tanto na presença quanto na ausência de colestase, mas o efeito foi mais acentuado na ausência de colestase do que na sua presença.

**Tabela 7: BALANÇO NITROGENADO (g)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	1,84	1,72	0,58	1,46
Máximo	2,16	2,26	0,99	1,89
Mínimo	1,48	1,54	-0,33	0,83
AV	0,68	0,71	1,33	1,05
DI	0,34	0,54	0,68	0,62
Média	1,83	1,81	0,44	1,38
DP	0,21	0,27	0,4	0,38
CV (%)	12,07	14,91	101,58	28,08

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 9 e 10)

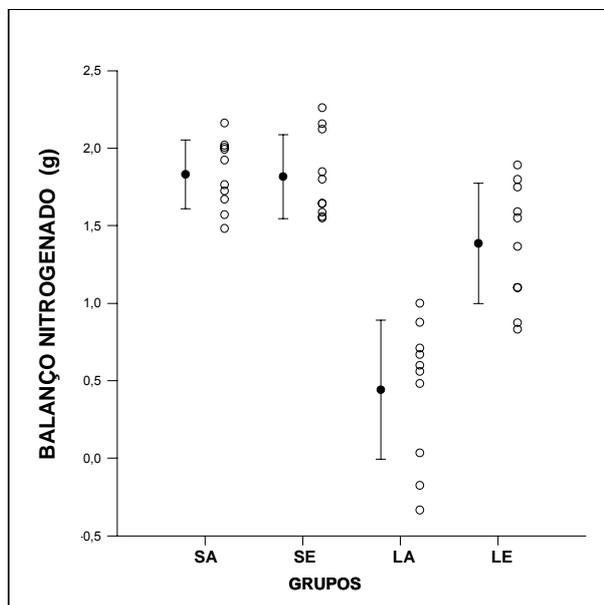
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

$(LA + LE) < (SA + SE) p < 0,001$ .: *significativa*

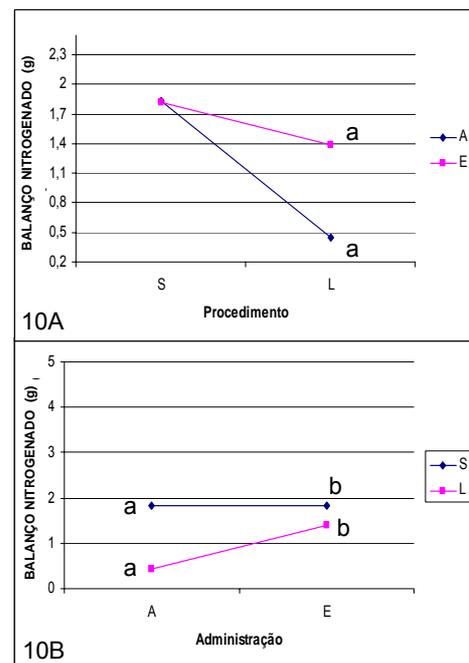
$(LA + SA) < (LE + SE) p < 0,005$ .: *significativa*

\*Interação  $p < 0,001$ .: *significativa*

SNK –  $(LA < LE) / (LA < SA) / (LE < SE) / (SA \approx SE)$



**Figura 9 – Balanço nitrogenado** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 10 – Balanço nitrogenado** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu significativamente o balanço nitrogenado e a vitamina E-TPGS atenuou esse efeito.

**Tabela 8: GANHO DE PESO (g)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	20,00	27,50	6,00	26,00
Máximo	35,00	40,00	20,00	39,00
Mínimo	8,00	12,00	1,00	6,00
AV	27,00	28,00	19,00	33,00
DI	19,00	19,00	10,00	15,00
Média	21,00	26,10	8,00	27,00
DP	9,34	9,87	6,41	10,33
CV (%)	44,48	37,82	80,13	38,26

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 11 e 12)

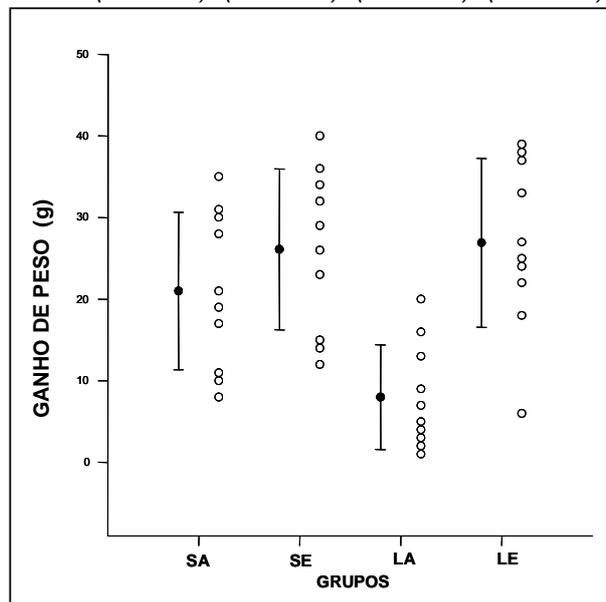
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) < (SA + SE)  $p = 0,043$ .: *significativa*

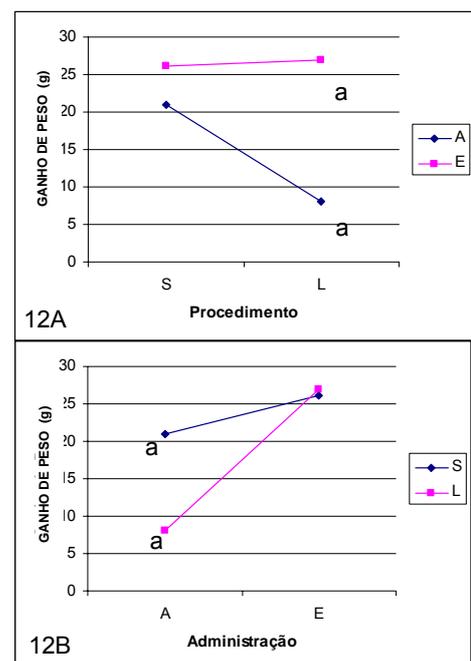
(LA + SA) < (LE + SE)  $p = <0,001$ .: *significativa*

\*Interação  $p = 0,023$ .: *significativa*

SNK – (LA < LE)/ (LA < SA)/ (LE ≈ SE)/ (SA ≈ SE)



**Figura 11 – Ganho de peso** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 12 – Ganho de peso** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu significativamente o ganho de peso e a vitamina E-TPGS corrigiu este efeito.

**Tabela 9: PESO FRESCO DA CARÇAÇA (g)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	16,50	15,50	24,00	35,50
Máximo	158,40	176,40	121,86	159,42
Mínimo	105,03	77,74	29,07	73,00
AV	53,37	98,66	92,79	86,42
DI	27,09	20,39	48,59	43,20
Média	135,95	132,85	85,05	124,17
DP	16,90	25,38	33,54	27,69
CV (%)	12,43	19,10	39,44	22,30

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 13 e 14)

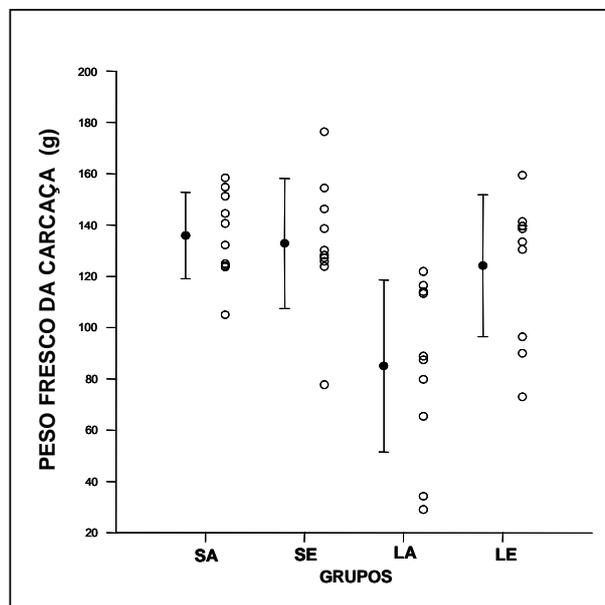
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) < (SA + SE)  $p = 0,001$ .: *significativa*

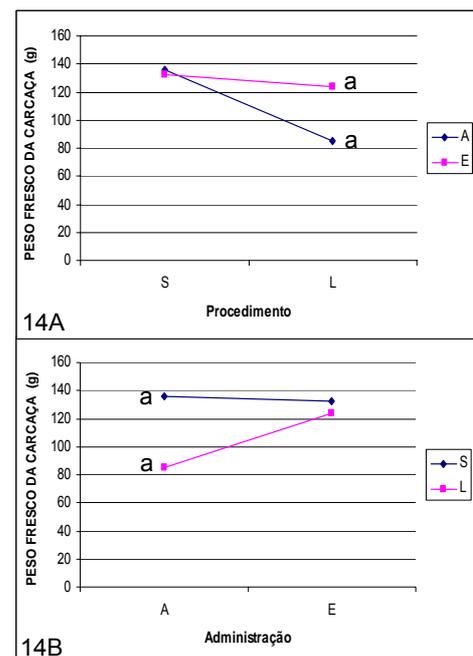
(LA + SA) < (LE + SE)  $p = 0,039$ .: *significativa*

\*Interação  $p = 0,017$ .: *significativa*

SNK – (LA < LE)/ (LA < SA)/ (LE ≈ SE)/ (SA ≈ SE)



**Figura 13 – Peso fresco da carcaça** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 14 – Peso fresco da carcaça** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu o peso da carcaça e a vitamina E-TPGS corrigiu esse efeito.

**Tabela 10: CONTEÚDO DE ÁGUA DA CARÇAÇA (g/100g do animal) - Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	21,00	32,00	9,00	18,50
Máximo	40,00	38,00	39,00	27,00
Mínimo	3,00	4,00	2,00	1,00
AV	37,00	34,00	37,00	26,00
DI	15,00	8,00	17,00	13,00
Média	21,20	28,60	15,10	16,80
DP	10,75	10,85	13,03	8,20
CV (%)	50,00	38,00	86,30	48,80

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

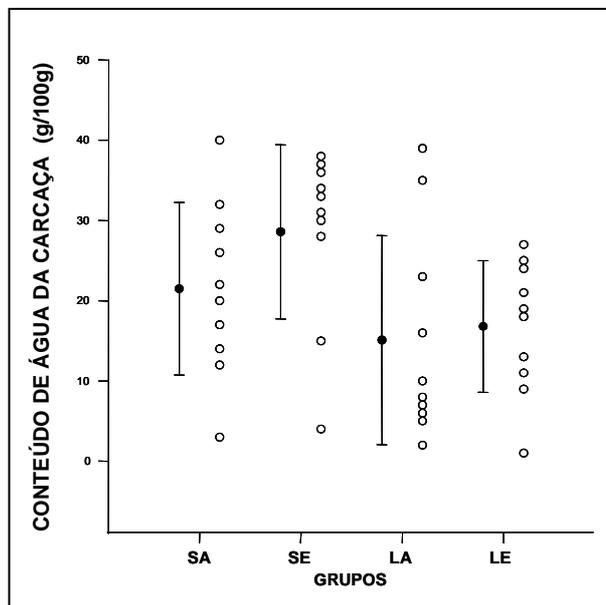
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 15 e 16)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

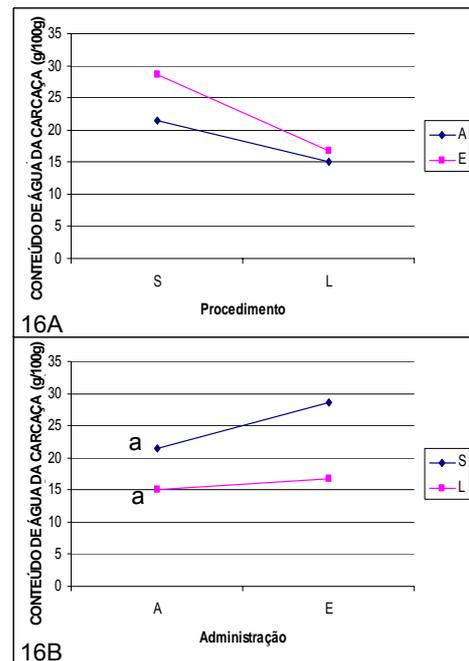
(LA + LE) < (SA + SE)  $p = <0,005$  ∴ *significativa*

(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,208$  ∴ *não significativa*

\*Interação  $p = 0,436$  ∴ *não significativa*



**Figura 15 – Conteúdo de água da carcaça** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 16 – Conteúdo de água da carcaça** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu o conteúdo de água da carcaça. A vitamina E-TPGS não interferiu nesse efeito.

**Tabela 11: CONTEÚDO DE GORDURA DA CARÇAÇA (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	16,00	25,00	16,50	30,50
Máximo	32,00	38,00	40,00	39,00
Mínimo	1,00	4,00	2,00	9,00
AV	31,00	34,00	38,00	30,00
DI	15,00	25,00	13,00	14,00
Média	14,80	22,40	17,70	27,10
DP	9,95	12,79	11,57	9,93
CV (%)	67,29	57,09	65,37	36,64

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 17 e 18)

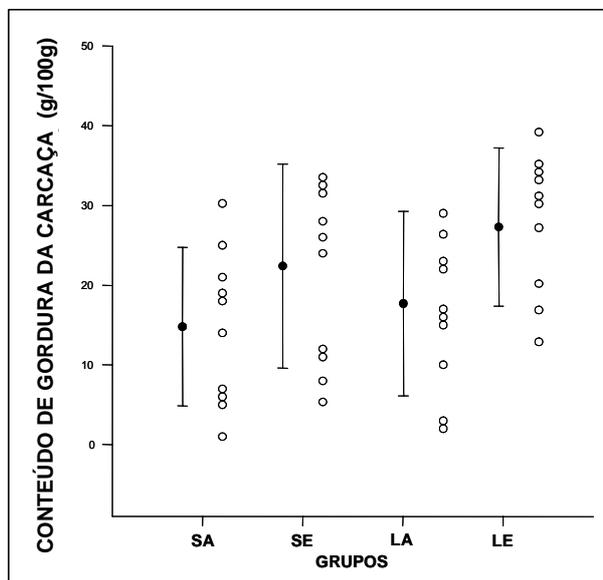
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE)  $\approx$  (SA + SE)  $p = 0,280$   $\therefore$  não significativa

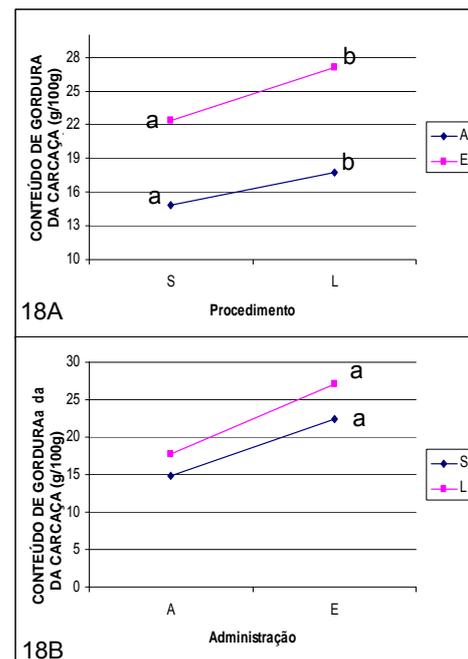
(LA + SA) < (LE + SE)  $p = 0,025$   $\therefore$  significativa

\*Interação  $p = 0,021$   $\therefore$  significativa

SNK – (LA < LE)/ (LA  $\approx$  SA)/ (LE  $\approx$  SE)/ (SA < SE)



**Figura 17 – Conteúdo de gordura da carcaça – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 18 – Conteúdo de gordura da carcaça – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** A vitamina E-TPGS elevou o conteúdo de gordura da carcaça tanto na presença quanto na ausência de colestase, mas esse efeito foi mais acentuado na presença de colestase.

## 4.1. RESUMO DOS RESULTADOS

1) **Primeira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações nutricionais decorrentes da colestase

**Tabela 12:** Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da primeira hipótese.

VARIÁVEL	FATORES		INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)		
Ração Ingerida (g)	$(LA + LE) < (SA + SE)$ $p = 0,016$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p = 0,001$ <b>significativo</b>	$p = 0,125$ <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=21,400 SE=27,300 LA=8,900 LE=24,400
Aproveitamento Nutricional (g)	$(LA + LE) < (SA + SE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$p < 0,001$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,001$ s. LA < SA $p < 0,01$ s. LE $\approx$ SE $p = 0,384$ n.s. SA $\approx$ SE $p = 0,217$ n.s.	<b>Médias</b> SA=0,361 SE=0,394 LA=0,205 LE=0,371
Conteúdo de Nitrogênio da Carça	$(LA + LE) \approx (SA + SE)$ $p = 0,351$ <b>não significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$p < 0,007$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,001$ s. LA $\approx$ SA $p = 0,182$ n.s. LE < SE $p < 0,011$ s. SA < SE $p < 0,001$ s.	<b>Médias</b> SA=11,056 SE=24,162 LA=12,316 LE=21,664
Balanço Nitrogenado	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p = 0,005$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p = 0,045$ <b>significativo</b>	$p = 0,029$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,05$ s. LA > SA $p < n.s.$ LE < SE $p < 0,05$ s. SA > SE $p < 0,001$ s.	<b>Médias</b> SA=16,100 SE=15,500 LA=18,400 LE=32,000
Ganho de Peso (g)	$(LA + LE) < (SA + SE)$ $p = 0,043$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p = < 0,001$ <b>significativo</b>	$p < 0,023$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,05$ s. LA < SA $p < 0,03$ s. LE $\approx$ SE $p = 0,85$ n.s. SA $\approx$ SE $p < 0,22$ n.s.	<b>Médias</b> SA=21,000 SE=26,100 LA=8,000 LE=26,900
Peso Fresco da Carça (g)	$(LA + LE) < (SA + SE)$ $p = 0,001$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p = 0,039$ <b>significativo</b>	$p < 0,017$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,001$ s. LA < SA $p < 0,001$ s. LE $\approx$ SE $p = 0,47$ n.s. SA $\approx$ SE $p < 0,79$ n.s.	<b>Médias</b> SA=135,94 SE=132,85 LA=85,049 LE=124,17

Tabela 12: Continuação

VARIÁVEL	FATORES		INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)		
Conteúdo de Água da Carçaça (g/100g animal)	$(LA + LE) < (SA + SE)$ $p = 0,012$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,208$ <b>não significativo</b>	$P = 0,436$ <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=21,500 SE=28,600 LA=15,100 LE=16,800
Conteúdo de Gordura da Carçaça (g/100g animal)	$(LA + LE) \approx (SA + SE)$ $p = 0,028$ <b>não significativa</b>	$(LA + SA) < (LE + SE)$ $p = 0,025$ <b>significativa</b>	$p = 0,021$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,05$ s. LA $\approx$ SA $p = 0,223$ n.s. LE $\approx$ SE = 0,351 n.s. SA $\approx$ SE $p = 0,135$ n.s.	<b>Médias</b> SA=16,100 SE=15,500 LA=18,400 LE=32,000

**A)** Efeitos do procedimento, colestase ou não, independentemente da administração ou não da vitamina E-TPGS; **B)** Efeitos da Vitamina E-TPGS, administração ou não do TPGS, independentemente do procedimento:colestase ou não; **C)** Interação e comparação múltipla pelo S.N.K (Student Newman Keuls); **D)** = Análise descritiva; **DP** = Desvio-Padrão, **s** = significativo; **n.s**= não significativo; **SA** = operação simulada com administração de água destilada; **SE** = operação simulada com administração de vitamina E-TPGS; **LA** = ligadura do ducto biliar comum com administração de água destilada; **LE** = ligadura do ducto biliar comum com administração de vitamina E-TPGS; **min** = minutos; **U/L** = Unidades Internacionais por Litro; **g** = grama

**2) Segunda Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações do metabolismo lipídico na colestase

Concentração sérica de triacilgliceróis	Tabela 13 figura 19 e 20 – <b>página 73</b>
Concentração sérica de colesterol total	Tabela 14, figura 21 e 22 – <b>página 74</b>
Concentração sérica de LDL-c	Tabela 15, figura 23 e 24 – <b>página 75</b>
Concentração sérica de VLDL-c	Tabela 16, figura 25 e 26 – <b>página 76</b>
Concentração sérica de HDL-c	Tabela 17, figura 27 e 28 – <b>página 77</b>
Tabela de resumo dos resultados	Tabela 18 – <b>página 78</b>

**Tabela 13: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TRIACÍLGLICERÓIS (g/dL) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
<b>Mediana</b>	64,50	47,00	109,00	153,50
<b>Máximo</b>	97,00	76,00	150,00	219,00
<b>Mínimo</b>	32,00	33,00	86,00	94,00
<b>AV</b>	65,00	43,00	64,00	125,00
<b>DI</b>	39,00	22,00	19,00	49,00
<b>Média</b>	64,70	50,60	110,80	151,80
<b>DP</b>	22,08	14,28	18,85	36,66
<b>CV (%)</b>	34,13	28,22	17,01	24,15

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 19 e 20)

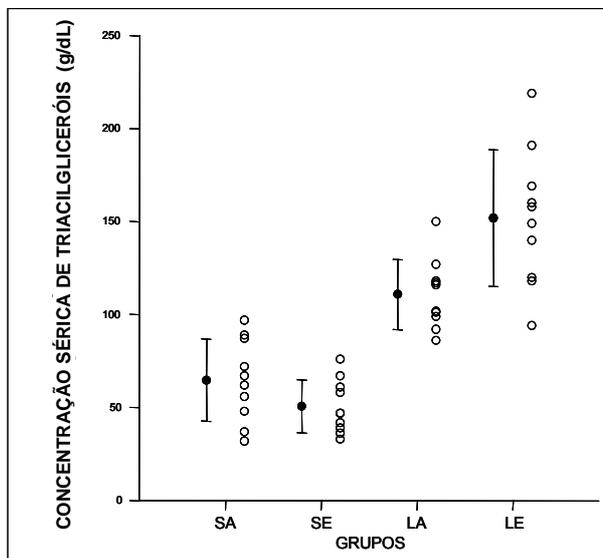
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0.001$  ∴ *significativa*

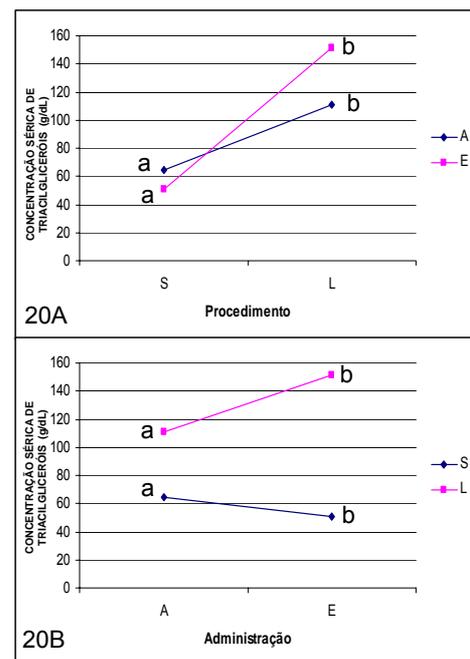
(LA + SA) ≈ (LE + SE)  $p = 0.090$  ∴ *não significativa*

\*Interação  $p = P = 0.001$  ∴ *significativa*

**SNK** – (LA < LE)/ (LA > SA)/ (LE > SE)/ (SA > SE)



**Figura 19 – Concentração sérica de triacilgliceróis**– Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 20 – Concentração sérica de triacilgliceróis** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou os níveis séricos de triacilgliceróis. A vitamina E-TPGS diminuiu os níveis sérico de triacilgliceróis na ausência de colestase e acentuou o aumento causado pela colestase.

**Tabela 14: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE COLESTEROL TOTAL (g/dL) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
<b>Mediana</b>	1,78	1,65	1,95	2,01
<b>Máximo</b>	1,84	1,79	2,11	2,20
<b>Mínimo</b>	1,60	1,39	1,79	1,75
<b>AV</b>	0,24	0,40	0,32	0,45
<b>DI</b>	1,00	2,20	0,90	1,50
<b>Média</b>	1,76	1,61	1,95	2,01
<b>DP</b>	0,08	0,13	0,09	0,13
<b>CV (%)</b>	4,55	8,01	4,60	6,50

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 21 e 22)

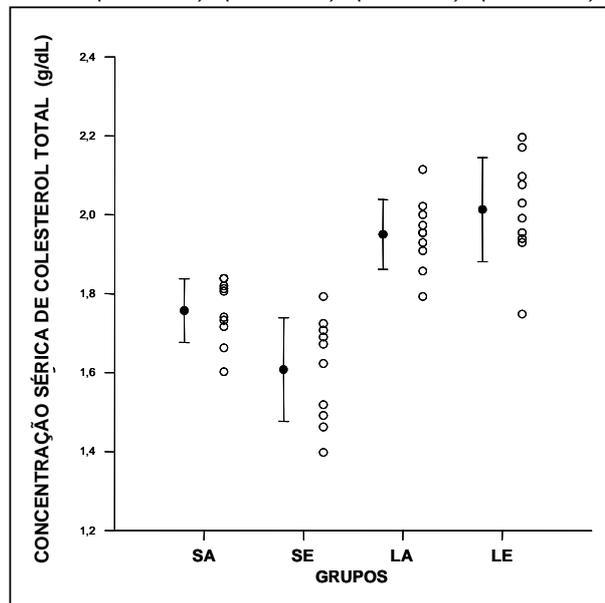
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância foram substituídos pelo número de ordem crescente (log10). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$ .: *significativa*

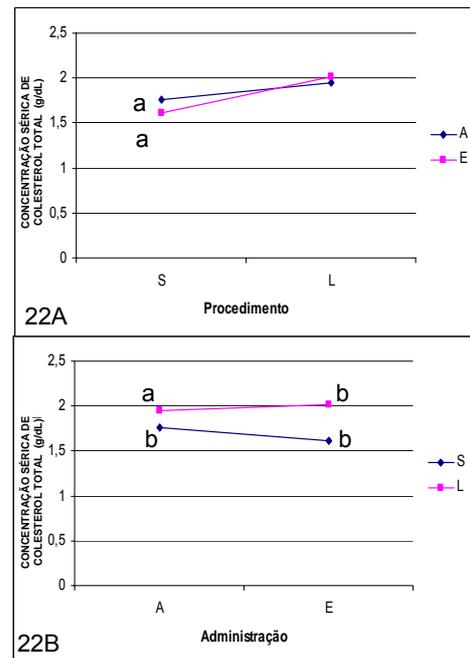
(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,225$ .: *não significativa*

\*Interação  $p = 0,005$ .: *significativa*

**SNK** – (LA  $\approx$  LE)/ (LA > SA)/ (LE > SE)/ (SA > SE)



**Figura 21 – Concentração Sérica Colesterol – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 22 – Concentração Sérica Colesterol – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** A colestase aumentou os níveis séricos de colesterol. A vitamina E-TPGS diminuiu os níveis de colesterol na ausência de colestase e não influenciou na presença de colestase.

**Tabela 15: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LDL-COLESTEROL (g/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
<b>Mediana</b>	3,10	3,20	6,30	6,30
<b>Máximo</b>	5,44	4,29	7,32	9,87
<b>Mínimo</b>	1,90	1,10	4,94	3,30
<b>AV</b>	3,54	3,19	2,38	6,57
<b>DI</b>	15,00	7,60	11,90	12,60
<b>Média</b>	3,34	2,92	6,10	6,70
<b>DP</b>	1,19	0,98	0,73	1,82
<b>CV (%)</b>	35,63	33,56	11,97	27,16

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

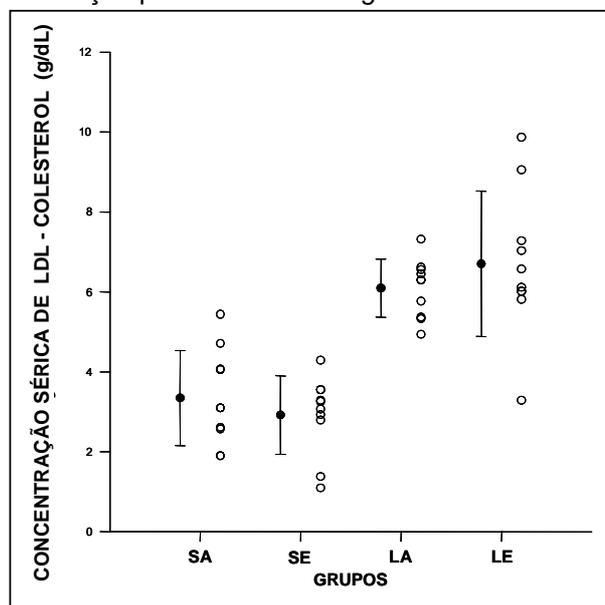
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 23 e 24)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância, foram substituídos pelo número de ordem crescente (sqr). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

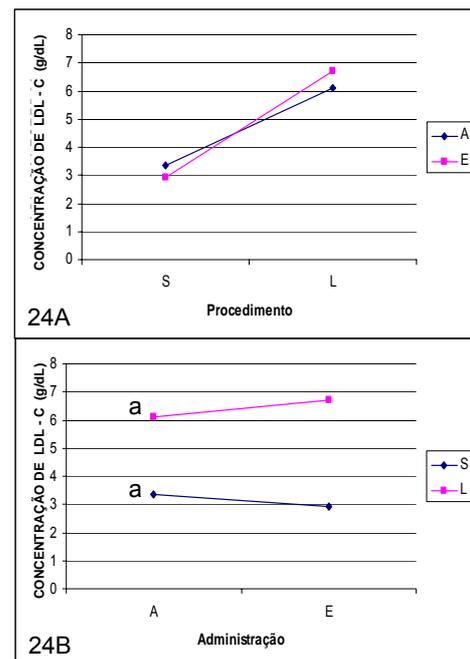
(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,815$  ∴ *não significativa*

\*Interação  $p = 0,197$  ∴ *não significativa*



**Figura 23 – Concentração Sérica de LDL-colesterol** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 24 – Concentração Sérica de LDL-colesterol** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou os níveis séricos de LDL. A vitamina E-TPGS não interferiu nesse efeito.

**Tabela 16: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE VLDL-COLESTEROL (g/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
<b>Mediana</b>	1,11	0,95	1,34	1,49
<b>Máximo</b>	1,23	1,13	1,48	1,64
<b>Mínimo</b>	0,81	0,82	1,24	1,26
<b>AV</b>	0,42	0,31	0,24	0,38
<b>DI</b>	0,26	0,20	0,07	0,16
<b>Média</b>	1,09	0,96	1,34	1,47
<b>DP</b>	0,16	0,11	0,07	0,12
<b>CV (%)</b>	14,68	11,46	5,22	8,16

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 25 e 26)

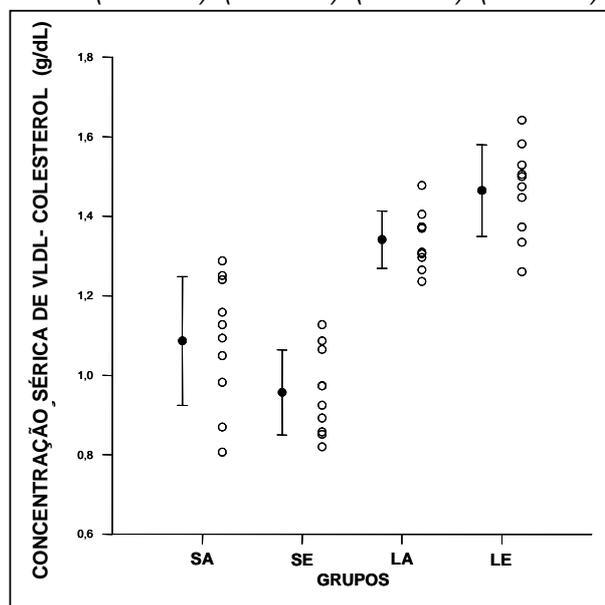
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância foram substituídos pelo número de ordem crescente (log). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E-Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

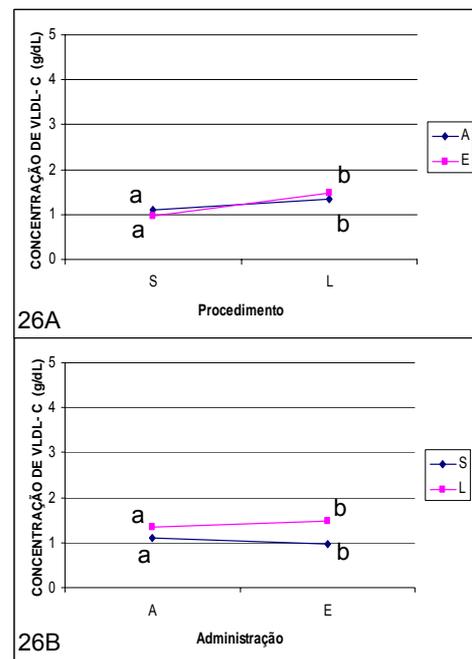
(LA + SA) ≈ (LE + SE)  $p = 0,938$  ∴ *não significativa*

\*Interação  $p = 0,002$  ∴ *significativa*

**SNK** – (LA < LE) / (LA > SA) / (LE > SE) / (SA > SE)



**Figura 25 – Concentração Sérica de VLDL-colesterol** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 26 – Concentração Sérica de VLDL-colesterol** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou significativamente os níveis séricos de VLDL. A vitamina E-TPGS diminuiu os níveis séricos de VLDL na ausência de colestase e acentuou o aumento causado pela colestase.

**Tabela 17: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HDL-COLESTEROL (g/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
<b>Mediana</b>	32,50	26,50	30,00	28,50
<b>Máximo</b>	48,00	37,00	56,00	38,00
<b>Mínimo</b>	18,00	10,00	14,00	15,00
<b>AV</b>	30,00	27,00	42,00	23,00
<b>DI</b>	8,00	19,00	16,00	9,00
<b>Média</b>	32,60	23,70	31,10	29,20
<b>DP</b>	8,11	9,66	13,03	7,73
<b>CV (%)</b>	24,88	40,76	41,90	26,50

**SA** – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. **SE** – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. **LA** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. **LE** – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

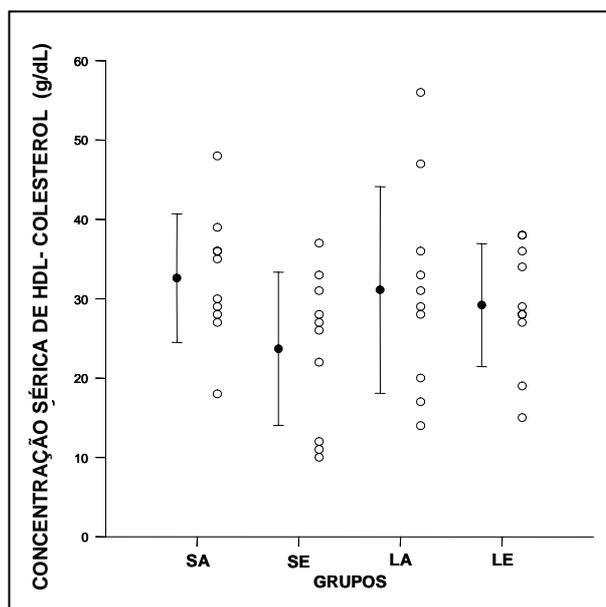
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 27 e 28)

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

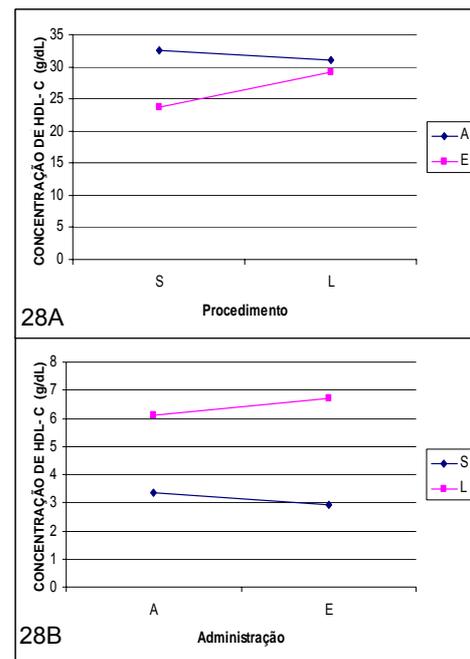
(LA + LE)  $\approx$  (SA + SE)  $p = 0.525$  ∴ não significativa

(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0.092$  ∴ não significativa

\*Interação  $p = 0.269$  ∴ não significativa



**Figura 27 – Concentração Sérica de HDL-Colesterol – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 28 – Concentração Sérica de HDL- Colesterol – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** Não pudemos demonstrar efeito tanto da colestase quanto da administração de vitamina E-TPGS sobre a concentração sérica de HDL – colesterol.

## 4.2. RESUMO DOS RESULTADOS

2) **Segunda Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as alterações do metabolismo lipídico na colestase.

### ❖ METABOLISMO LIPÍDICO

**Tabela 18:** Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da segunda hipótese

VARIÁVEL	FATORES		INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)		
<b>Concentração Sérica de Triacilgliceróis (g/dL)</b>	(LA + LE) > (SA + SE) p < 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) ≈ (SE + LE) p = 0,09 <b>não significativo</b>	p = 0,001 <b>significativo</b> LA < LE p < 0,05 s. LA > SA p < 0,05 s. LE > SE p < 0,05 s. SA > SE p < 0,05 s.	<b>Médias</b> SA=64.70 SE=50.60 LA=110.80 LE=151.80
<b>Concentração Sérica de Colesterol Total (g/dL)</b>	(LA + LE) > (SA + SE) p < 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) ≈ (SE + LE) p = 0,225 <b>não significativo</b>	p = 0,005 <b>significativo</b> LA ≈ LE p = 0,12 n.s. LA > SA p < 0,05 s. LE > SE p < 0,05 s. SA > SE p < 0,05 s.	<b>Médias</b> SA=1.757 SE=1.608 LA=1.950 LE=2.013
<b>LDL – Colesterol (g/dL)</b>	(LA + LE) > (SA + SE) p < 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) ≈ (SE + LE) p = 0,815 <b>não significativo</b>	p = 0,197 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=33.44 SE=29.20 LA=60.95 LE=67.05
<b>VLDL – Colesterol (g/dL)</b>	(LA + LE) > (SA + SE) p < 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) ≈ (SE + LE) p = 0,938 <b>não significativo</b>	p = 0,002 <b>significativo</b> LA < LE p < 0,05 s. LA > SA p < 0,05 s. LE > SE p < 0,05 s. SA > SE p < 0,05 s.	<b>Médias</b> SA=1.086 SE=0.957 LA=1.341 LE=1.465
<b>HDL – Colesterol (g/dL)</b>	(LA + LE) > (SA + SE) p = 0,525 <b>não significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p = 0,092 <b>não significativo</b>	p = 0,269 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=32.600 SE=23.700 LA=31.100 LE=29.200

**A)** Efeitos do procedimento, colestase ou não, independentemente da administração ou não da vitamina E-TPGS; **B)** Efeitos da Vitamina E-TPGS, administração ou não do TPGS, independentemente do procedimento: colestase ou não; **C)** Interação e comparação múltipla pelo S.N.K (Student Newman Keuls); **D)** = Análise descritiva; **s** = significativo; **n.s** = não significativo; **SA** = operação simulada com administração de água destilada; **SE** = operação simulada com administração de vitamina E-TPGS; **LA** = ligadura do ducto biliar comum com administração de água destilada; **LE** = ligadura do ducto biliar comum com administração de vitamina E-TPGS; **min** = minutos; **UI/L** = Unidades Internacionais por Litro; **g** = grama.

- 3) Terceira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as lesões hepáticas decorrentes da colestase.

## Função Hepática

Tempo de sono	Tabela 19, figura 29 e 30 – <b>página 80</b>
Concentração sérica de albumina	Tabela 20, figura 31 e 32 – <b>página 81</b>

## Lesão Hepática

Atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST)	Tabela 21, figura 33 e 34 – <b>página 82</b>
Atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT)	Tabela 22, figura 35 e 36 – <b>página 83</b>
Concentração sérica de globulinas	Tabela 23, figura 37 e 38 – <b>página 84</b>
Concentração sérica de vitamina E	Tabela 24, figura 39 e 40 – <b>página 85</b>
Concentração sérica de vitamina A	Tabela 25, figura 41 e 42 – <b>página 86</b>
Peso fresco do fígado	Tabela 26, figura 43 e 44 – <b>página 87</b>
Conteúdo de água do fígado	Tabela 27, figura 45 e 46 – <b>página 88</b>
Conteúdo de gordura do fígado	Tabela 28, figura 47 e 48 – <b>página 89</b>
Peso fresco do baço	Tabela 29, figura 49 e 50 – <b>página 90</b>
Conteúdo de água do baço	Tabela 30, figura 51 e 52 – <b>página 91</b>
Intensidade de fibrose portal	Tabela 31, figura 53 e 54 – <b>página 92</b>
Número de áreas de necrose	Tabela 32, figura 55 e 56 – <b>página 93</b>
Intensidade da proliferação ductal	Tabela 33, figura 57 e 58 – <b>página 94</b>
Intensidade da esteatose hepática	Tabela 34, figura 59 e 60 – <b>página 95</b>
Intensidade da degeneração hidrópica	Tabela 35, figura 61 e 62 – <b>página 96</b>
Intensidade da inflamação	Tabela 36, figura 63 e 64 – <b>página 97</b>
Frequência de mitose	Tabela 37, figura 65 e 66 – <b>página 98</b>
Tabela de resumo dos resultados	Tabelas 38 e 39 – <b>páginas 99 e 100</b>

**Tabela 19: TEMPO DE SONO (min) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (min)	SA	SE	LA	LE
Mediana	4,49	4,10	5,52	4,49
Máximo	5,19	4,36	5,89	5,08
Mínimo	4,13	3,40	4,95	3,83
AV	1,06	0,96	0,94	1,25
DI	0,41	0,59	0,33	0,75
Média	4,57	3,98	5,48	4,41
DP	0,33	0,34	0,27	0,43
CV (%)	7,22	8,54	4,93	9,75

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 29 e 30)

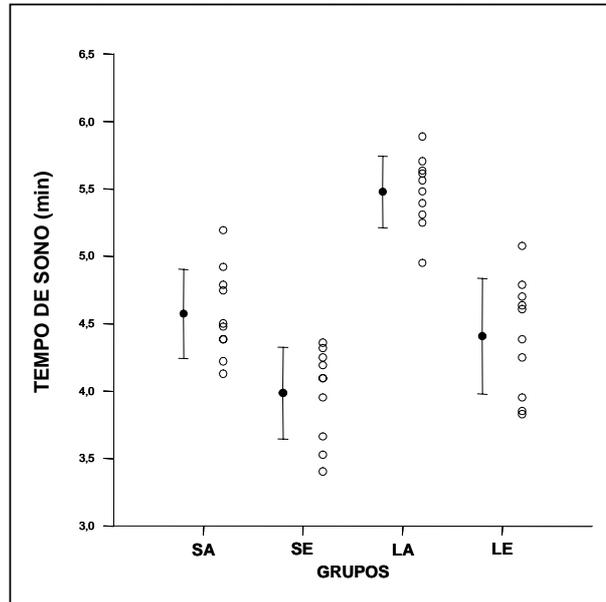
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (ln). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E-Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE) p = <0,001 .: *significativa*

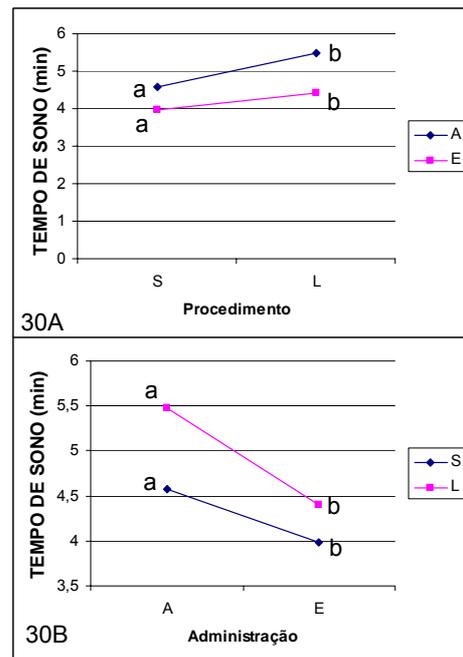
(LA + SA) > (LE + SE) p = <0,001 .: *significativa*

\*Interação p = 0,034 .: *significativa*

SNK – (LA > LE)/ (LA > SA)/ (LE > SE)/ (SA > SE)



**Figura 29 – Tempo de sono – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 30 – Tempo de sono – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK (p<0,05).**

**Conclusões:** A colestase aumentou significativamente o tempo de sono. A vitamina E-TPGS diminuiu o tempo de sono na ausência de colestase e atenuou o aumento causado pela colestase.

**Tabela 20: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ALBUMINA (g/dL)** – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
Mediana	18,00	31,00	8,00	23,70
Máximo	31,00	39,00	40,00	38,00
Mínimo	12,00	21,50	2,00	2,00
AV	19,00	17,50	38,00	36,00
DI	6,50	10,00	5,50	24,50
Média	19,80	30,65	10,95	20,60
DP	6,76	5,65	10,98	13,16
CV (%)	34,14	18,43	100,27	63,88

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

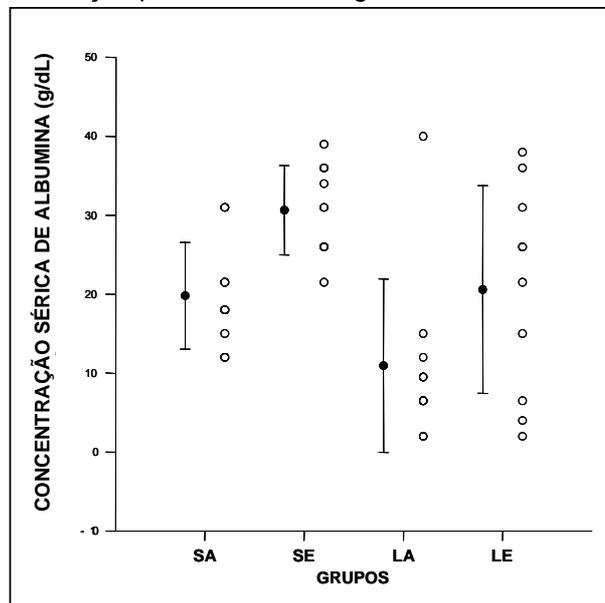
### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 31 e 32)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

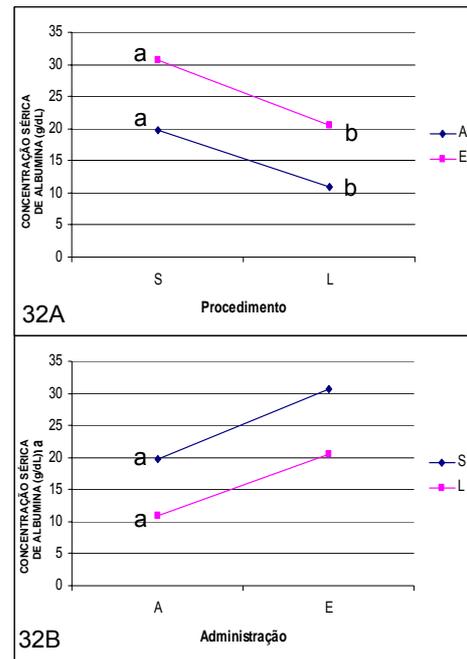
(LA + LE) < (SA + SE)  $p = 0,004$  ∴ *significativa*

(LA + SA) < (LE + SE)  $p = 0,002$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,845$  ∴ *não significativa*



**Figura 31 – Concentração Sérica de Albumina** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 32 – Concentração Sérica de Albumina** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

Conclusões: A colestase diminuiu os níveis séricos de albumina, independentemente da administração de vitamina E-TPGS. A vitamina E-TPGS aumentou os níveis séricos de albumina, independentemente da colestase. Não houve interação entre vitamina E-TPGS e colestase.

**Tabela 21: ATIVIDADE SÉRICA DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) (UI/L) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (UI/L)	SA	SE	LA	LE
Mediana	12,00	9,75	33,50	27,00
Máximo	20,00	18,00	38,00	40,00
Mínimo	3,50	1,00	26,00	21,00
AV	16,50	17,00	12,00	19,00
DI	10,50	9,00	7,50	9,00
Média	11,80	9,20	32,50	28,50
DP	6,17	5,63	4,30	6,82
CV (%)	52,29	61,20	13,23	23,93

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

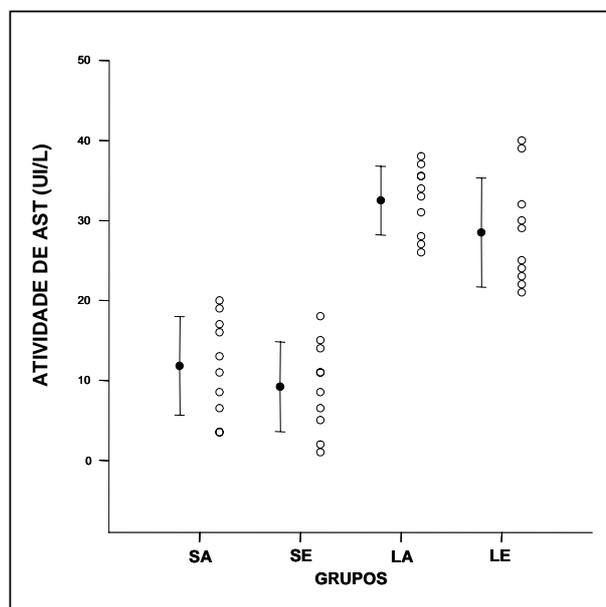
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 33 e 34)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

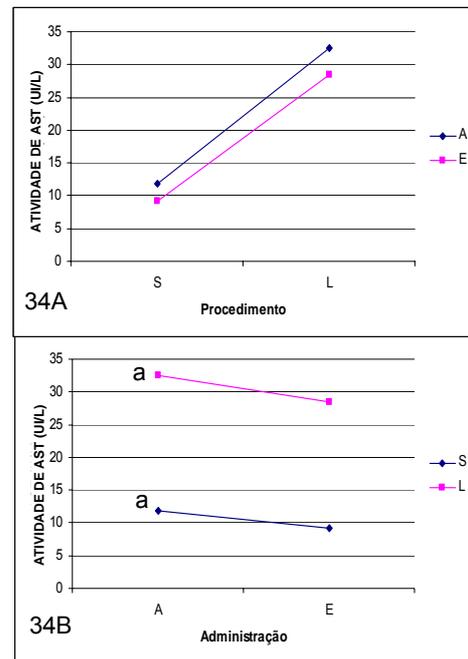
(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$ .: *significativa*

(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,081$ .: *não significativa*

\*Interação  $p = 0,065$ .: *não significativa*



**Figura 33 – AST – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatro grupos.**



**Figura 34 – AST – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b).** Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou a atividade sérica de aspartato aminotransferase. A vitamina E-TPGS não interferiu nesse efeito.

**Tabela 22: ATIVIDADE SÉRICA DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) (UI/L) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (UI/L)	SA	SE	LA	LE
Mediana	57,50	40,50	121,50	68,00
Máximo	76,00	79,00	165,00	142,00
Mínimo	38,00	21,00	79,00	41,00
AV	38,00	58,00	86,00	101,00
DI	13,00	18,00	31,00	33,00
Média	57,60	43,10	120,80	78,30
DP	11,70	17,60	25,60	32,61
CV (%)	20,31	40,84	21,19	41,65

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

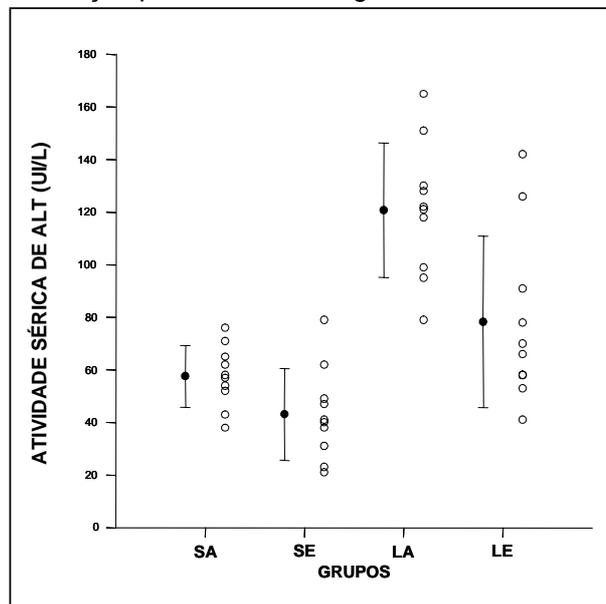
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 35 e 36)

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

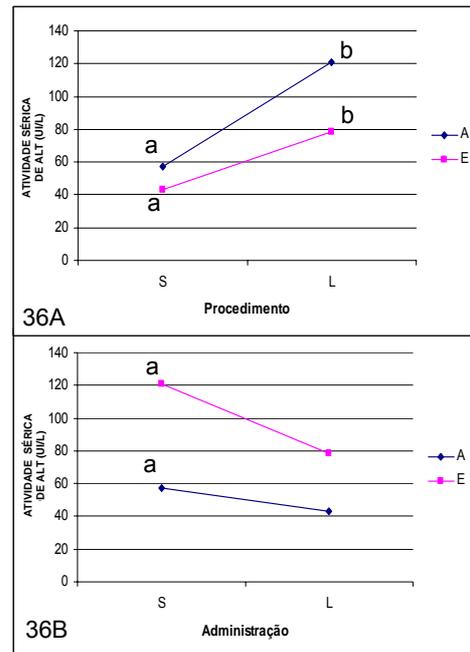
(LA + LE) > (SA + SE) p = <0,001.: *significativa*

(LA + SA) > (LE + SE) p = <0,001.: *significativa*

\*Interação p = 0,065.: *não significativa*



**Figura 35 – ALT – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 36 – ALT – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK (p<0,05).**

**Conclusões:** A colestase aumentou a atividade sérica de alanina aminotransferase, independentemente da administração de vitamina E-TPGS. A vitamina E-TPGS diminuiu a atividade sérica alanina aminotransferase, independentemente da colestase. Não houve interação entre vitamina E-TPGS e colestase.

**Tabela 23: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLOBULINAS (g/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/dL)	SA	SE	LA	LE
Mediana	3,32	2,86	6,69	4,37
Máximo	4,95	4,26	7,03	6,36
Mínimo	3,00	2,46	4,71	3,49
AV	1,95	1,80	2,32	2,87
DI	0,35	0,29	0,64	0,66
Média	3,62	2,97	6,23	4,47
DP	0,61	0,52	0,84	0,77
CV (%)	16,85	17,51	13,48	17,22

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 37 e 38)

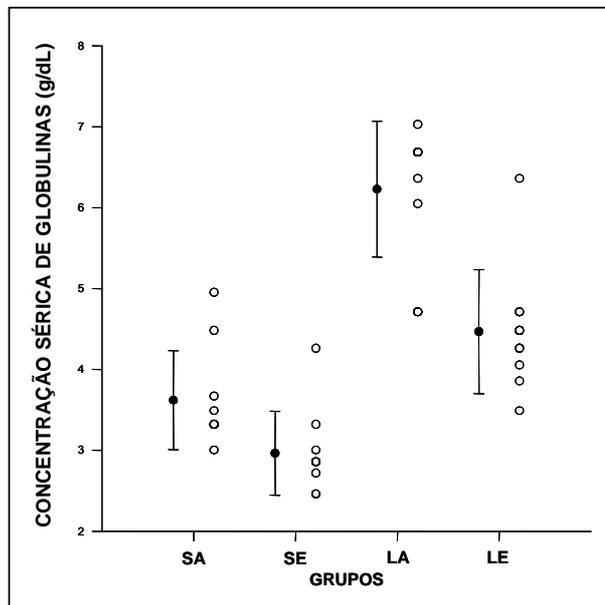
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância foram substituídos pelo número de ordem crescente (sqr). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE) p = <0,001.: *significativa*

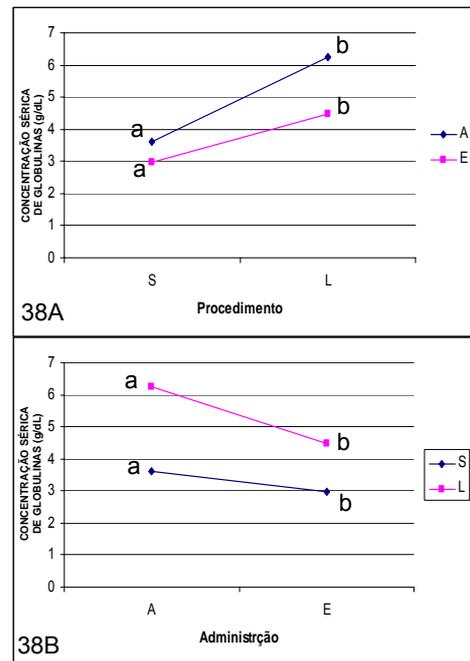
(LA + SA) > (LE + SE) p = <0,001.: *significativa*

\*Interação p = 0,016.: *significativa*

SNK – (LA > LE)/ (LA > SA)/ (LE > SE)/ (SA > SE)



**Figura 37– Concentração sérica de globulinas –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 38 – Concentração sérica de globulinas –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK (p<0,05).

**Conclusões:** A colestase aumentou significativamente os níveis séricos de globulinas. A vitamina E-TPGS diminuiu os níveis séricos de globulinas na ausência de colestase e atenuou o aumento causado pela colestase. O efeito foi mais acentuado na colestase.

**Tabela 24: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE VITAMINA E (mg/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (mg/dL)	SA	SE	LA	LE
Mediana	8,60	17,63	1,11	5,40
Máximo	9,73	21,24	2,50	7,30
Mínimo	5,45	16,02	0,57	3,44
AV	4,28	5,22	1,93	3,86
DI	1,06	2,28	0,46	2,06
Média	8,21	18,03	1,17	5,45
DP	1,24	1,77	0,55	1,36
CV (%)	15,10	9,82	47,01	24,95

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 39 e 40)

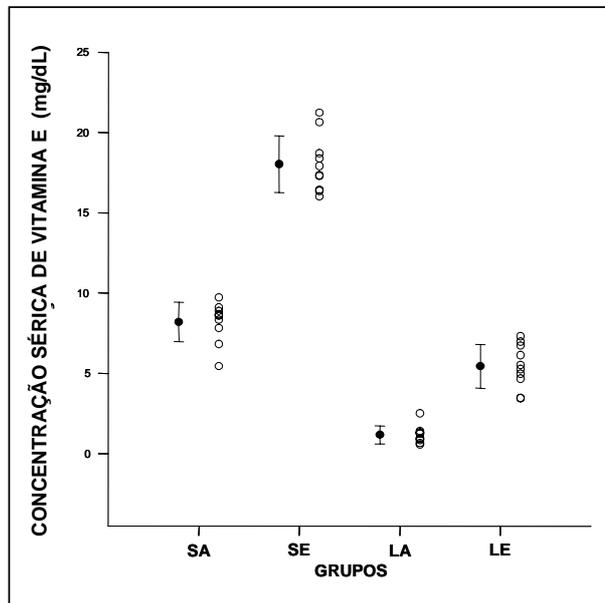
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) < (SA + SE) p = <0,001.: *significativa*

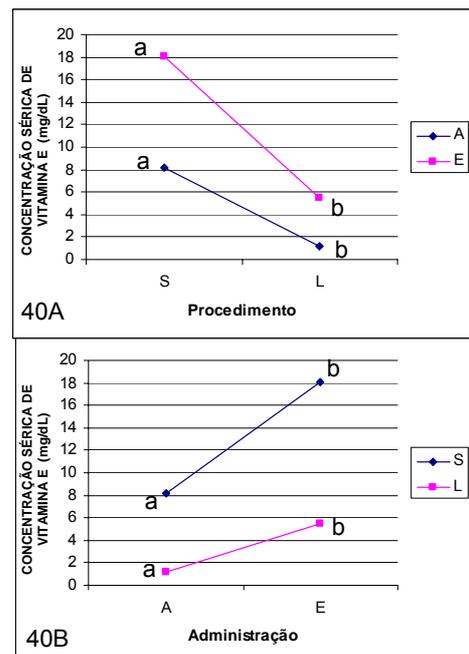
(LA + SA) < (LE + SE) p = <0,001.: *significativa*

\*Interação p = <0,001.: *significativa*

SNK – (LA < LE)/ (LA < SA)/ (LE < SE)/ (SA < SE)



**Figura 39 – Concentração sérica de vitamina E –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 40 – Concentração sérica de vitamina E –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK (p<0,05).

**Conclusões:** A colestase diminuiu os níveis séricos de vitamina E. A administração de vitamina E-TPGS elevou os níveis séricos de vitamina E na ausência de colestase e acentuou o aumento causado pela colestase.

**Tabela 25: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE VITAMINA A (mg/dL) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (mg/dL)	SA	SE	LA	LE
Mediana	1,33	1,80	0,51	1,03
Máximo	1,72	2,01	1,01	1,43
Mínimo	1,01	1,36	0,34	0,67
AV	0,71	0,65	0,67	0,76
DI	0,21	0,30	0,19	0,46
Média	1,36	1,76	0,58	1,09
DP	0,19	0,22	0,23	0,26
CV (%)	13,97	12,50	39,66	23,85

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

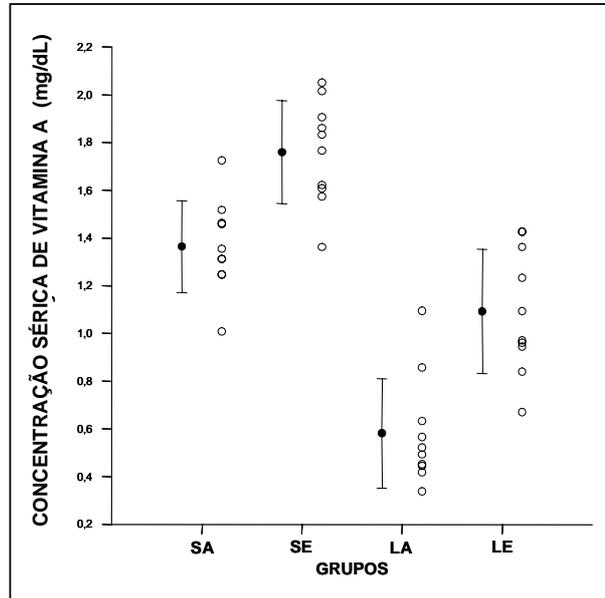
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 41 e 42)

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

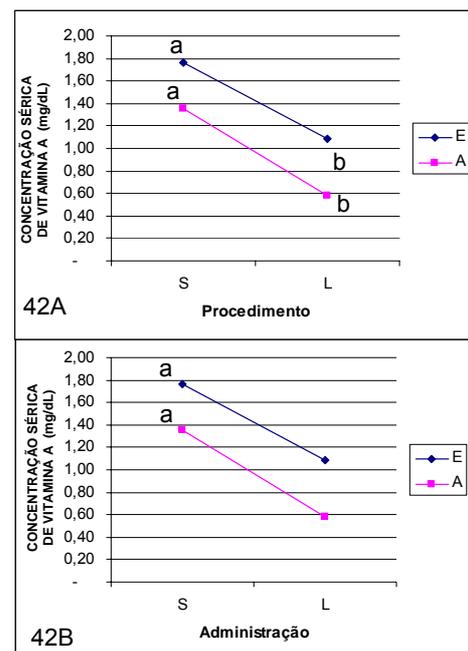
(LA + LE) < (SA + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

(LA + SA) < (LE + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,425$  ∴ *não significativa*



**Figura 41 – Concentração sérica de vitamina A –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 42 – Concentração sérica de vitamina A –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase diminuiu os níveis séricos de vitamina A, independentemente da administração de vitamina E-TPGS. A vitamina E aumentou os níveis séricos de vitamina A, independentemente da colestase. Não houve interação entre vitamina E-TPGS e colestase.

**Tabela 26: PESO FRESCO DO FIGADO (por 100g de peso do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	16,50	15,50	24,00	35,50
Máximo	27,00	31,00	32,00	40,00
Mínimo	5,00	4,00	1,00	7,00
AV	22,00	27,00	31,00	33,00
DI	16,00	8,00	26,00	5,00
Média	16,10	15,50	18,40	32,00
DP	8,27	7,47	12,70	10,27
CV (%)	51,37	48,19	69,02	32,09

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 43 e 44)

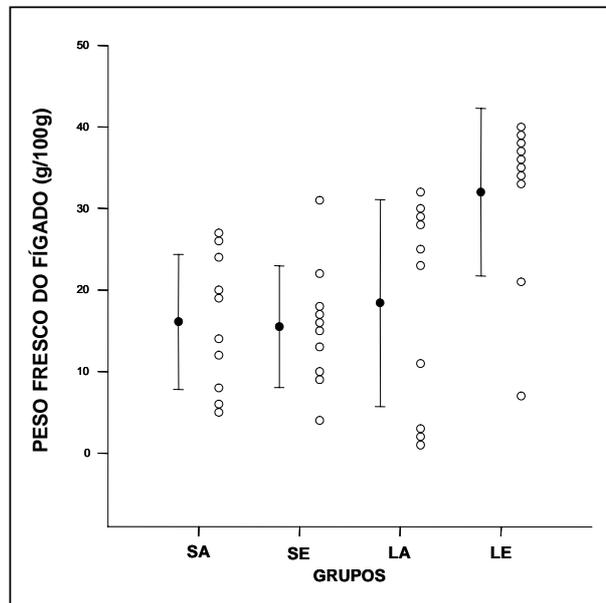
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE) p = 0,005.: *significativa*

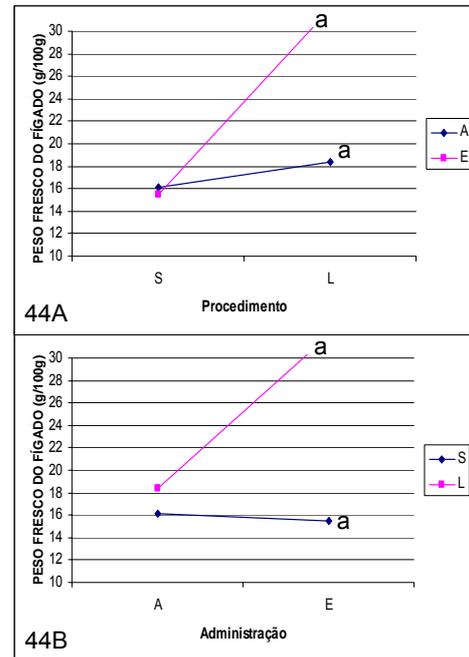
(LA + SA) > (LE + SE) p = 0,045.: *significativa*

\*Interação p = 0,029.: *significativa*

SNK – (LA < LE)/ (LA ≈ SA)/ (LE > SE)/ (SA ≈ SE)



**Figura 43 – Peso fresco do fígado – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 44 – Peso fresco do fígado – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK (p<0,05).**

**Conclusões:** A colestase aumentou o peso fresco do fígado. A vitamina E-TPGS acentuou esse efeito.

**Tabela 27: CONTEÚDO DE ÁGUA DO FÍGADO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	10,50	19,00	24,50	35,50
Máximo	21,00	28,00	33,00	40,00
Mínimo	3,00	5,00	1,00	14,00
AV	18,00	23,00	32,00	26,00
DI	9,00	8,00	25,00	7,00
Média	11,70	18,70	18,20	33,40
DP	5,70	6,90	13,23	7,55
CV (%)	48,72	36,90	72,69	22,60

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

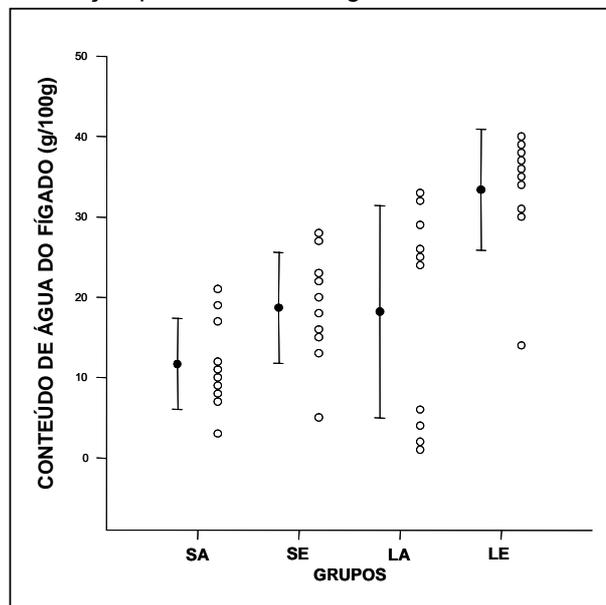
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 45 e 46)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

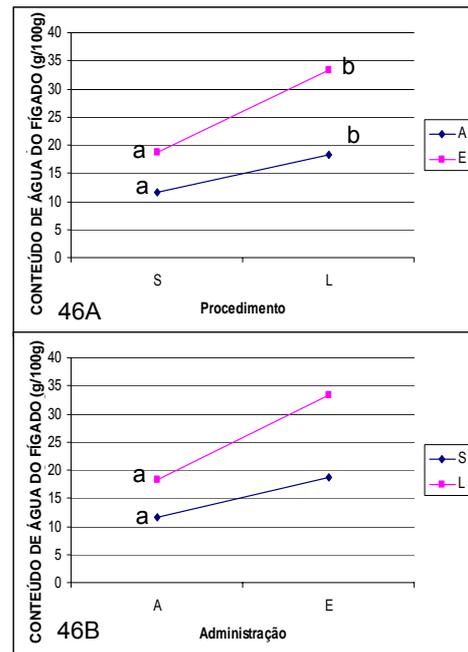
(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

(LA + SA) < (LE + SE)  $p = <0,001$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,151$  ∴ *não significativa*



**Figura 45 – Conteúdo de água do fígado – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 46 – Conteúdo de água do fígado– Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** A colestase aumentou o conteúdo de água do fígado, independentemente da administração de vitamina E-TPGS. A vitamina E-TPGS aumentou o conteúdo de água do fígado, independentemente da colestase. Não houve interação entre vitamina E-TPGS e colestase.

**Tabela 28: CONTEUDO DE GORDURA DO FIGADO (g/100g do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	11,00	27,50	15,00	34,50
Máximo	19,00	33,00	39,00	40,00
Mínimo	6,00	21,00	1,00	20,00
AV	13,00	12,00	38,00	20,00
DI	7,00	7,00	15,00	12,00
Média	11,60	27,40	15,10	27,90
DP	4,30	4,17	11,13	14,10
CV (%)	37,07	15,22	73,71	50,54

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

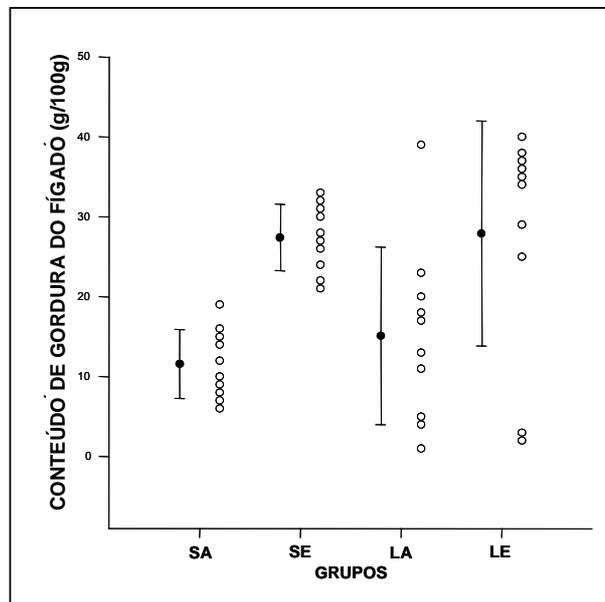
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 47 e 48)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

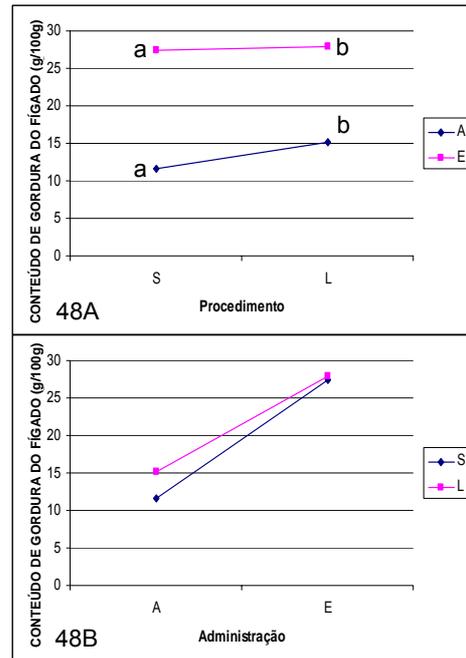
(LA + LE)  $\approx$  (SA + SE)  $p = 0,508$ .: não *significativa*

(LA + SA)  $<$  (LE + SE)  $p = <0,001$ .: *significativa*

\*Interação  $p = 0,619$ .: não *significativa*



**Figura 47 – Conteúdo de gordura do fígado – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 48 – Conteúdo de gordura do fígado – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** Não pudemos demonstrar efeito da colestase sobre o conteúdo de gordura do fígado. A vitamina E-TPGS aumentou o conteúdo de gordura do fígado, independentemente da colestase.

**Tabela 29: PESO FRESCO DO BAÇO (por 100g de peso do animal) – Estatística descritiva. Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)**

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	17,50	9,00	26,50	35,50
Máximo	26,00	27,00	34,00	40,00
Mínimo	1,00	3,00	2,00	13,00
AV	25,00	24,00	32,00	27,00
DI	6,00	8,00	22,00	10,00
Média	16,60	11,20	21,90	32,30
DP	6,85	7,44	12,28	8,33
CV (%)	41,27	66,43	56,07	25,79

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 49 e 50)

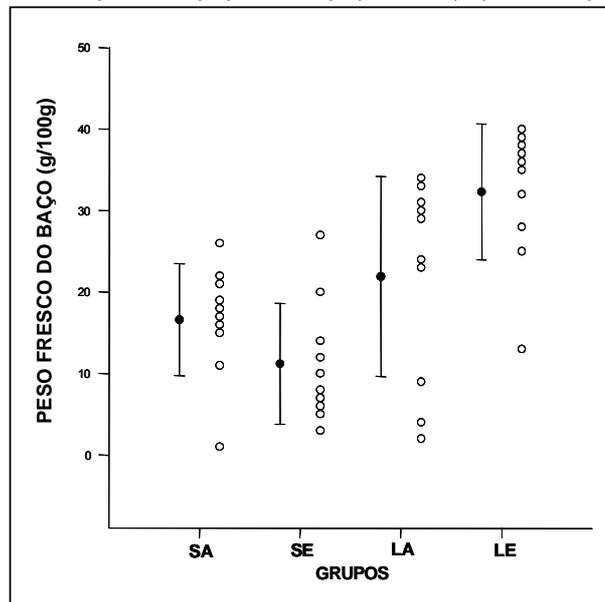
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p = <0,001$ .: *significativa*

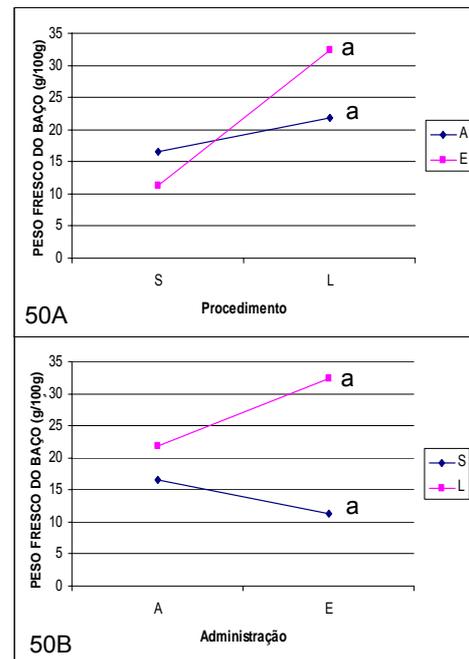
(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,384$ .: *não significativa*

\*Interação  $p = 0,009$ .: *significativa*

SNK – (LA < LE)/ (LA  $\approx$  SA)/ (LE > SE)/ (SA  $\approx$  SE)



**Figura 49 – Peso fresco do baço – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 50 – Peso fresco do baço – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** A colestase aumentou o peso fresco do baço e a vitamina E-TPGS acentuou esse efeito.

**Tabela 30: CONTEÚDO DE ÁGUA DO BAÇO (g/100g do animal) – Estatística descritiva.** Mediana, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI), média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV)

Grupos (g/100g)	SA	SE	LA	LE
Mediana	87,90	87,75	83,62	93,57
Máximo	132,72	109,51	88,65	100,44
Mínimo	65,47	80,90	31,33	85,57
AV	67,26	28,61	57,32	14,88
DI	5,54	16,77	26,52	7,53
Média	88,58	91,50	72,23	92,90
DP	18,13	10,02	20,24	5,23
CV (%)	20,47	10,07	28,01	5,62

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

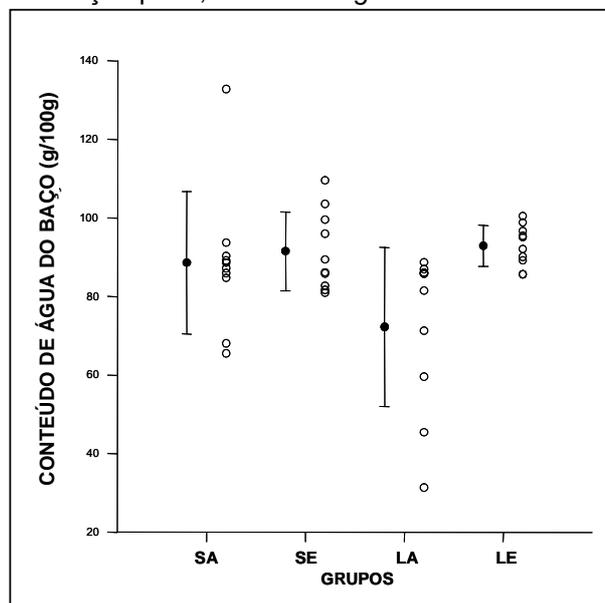
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 51 e 52)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E-Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

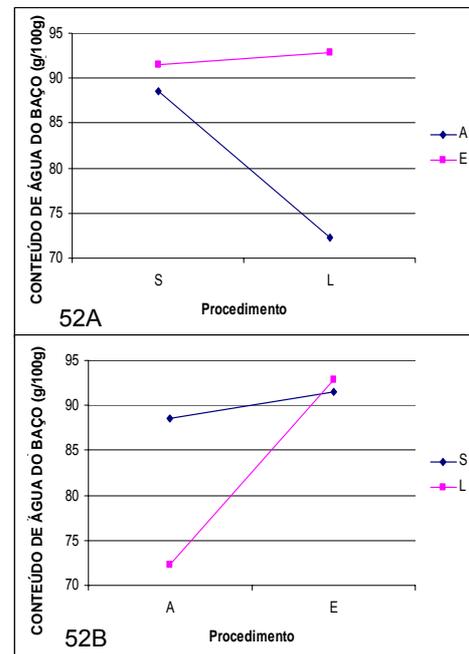
$(LA + LE) \approx (SA + SE)$   $p = P = 0,117$  ∴ *não significativa*

$(LA + SA) < (LE + SE)$   $p = 0,016$  ∴ *significativa*

\*Interação  $p = 0,064$  ∴ *não significativa*



**Figura 51 – Conteúdo de água do baço –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 52 – Conteúdo de água do baço –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** Não pudemos demonstrar efeito da colestase sobre o conteúdo de água do baço. A vitamina E-TPGS elevou o conteúdo de água do baço independentemente da colestase.

**Tabela 31: INTENSIDADE DA FIBROSE PORTAL – Estatística descritiva.** Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	0,00	2,00	1,00
Máximo	0,00	0,00	3,00	2,00
Mínimo	0,00	0,00	1,00	1,00
AV	0,00	0,00	2,00	1,00
DI	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	0,00	0,00	1,700	1,10
DP	0,00	0,00	0,68	0,32
CV (%)	-	-	40,0	32,0

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 53 e 54)

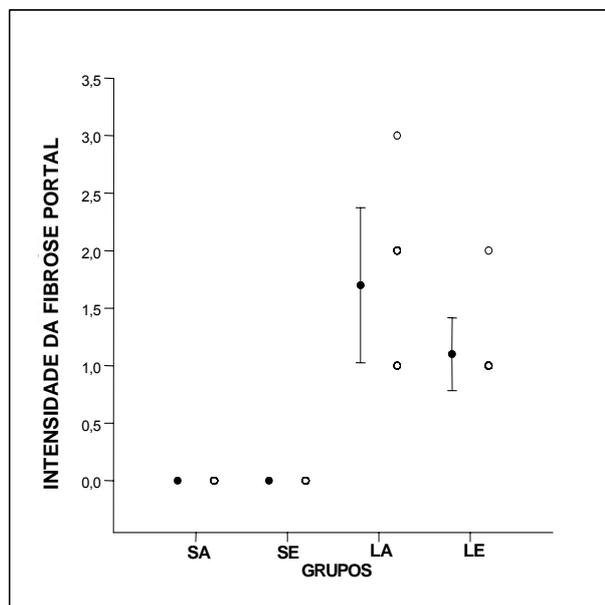
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p < P = 0,001$  ∴ *significativa*

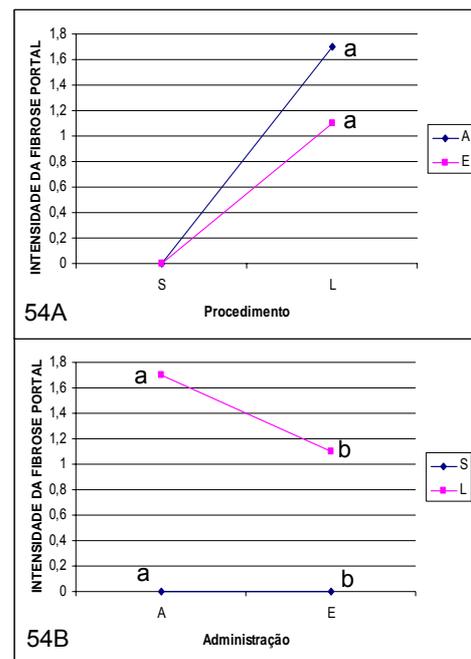
(LA + SA) ≈ (LE + SE)  $p = 0,055$  ∴ *não significativa*

\* Interação  $p = 0,015$  ∴ *significativa*

SNK – (LA > LE)/ (LA > SA)/ (LE >SE)/ (SA ≈ SE)



**Figura 53 – Intensidade da fibrose portal –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 54 – Intensidade da fibrose portal –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase causou deposição de tecido conjuntivo no fígado e a vitamina E-TPGS atenuou esse efeito.

**Tabela 32: NÚMERO DE ÁREAS DE NECROSE (10 campos/10x) – Estatística descritiva.** Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	0,00	8,00	2,00
Máximo	0,00	0,00	14,0	3,00
Mínimo	0,00	0,00	6,00	1,00
AV	0,00	0,00	8,00	2,00
DI	0,00	0,00	5,00	1,00
Média	0,00	0,00	9,300	2,200
DP	0,00	0,00	2,95	0,79
CV (%)	-	-	31,72	35,91

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 55 e 56)

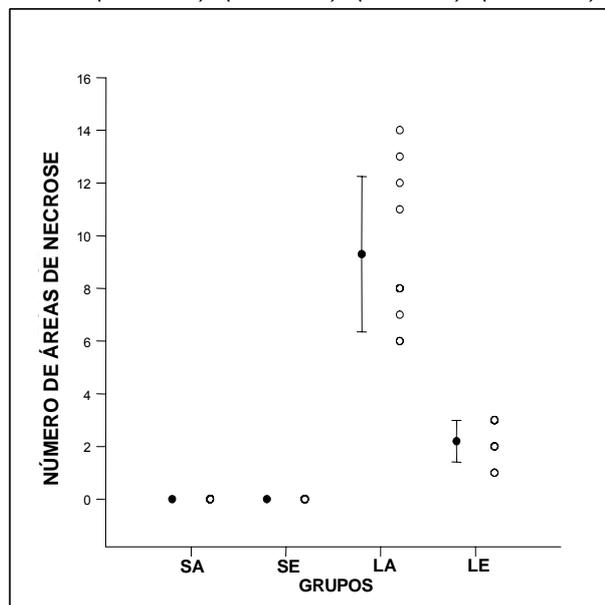
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

(LA + LE) > (SA + SE)  $p = 0,005$  ∴ *significativa*

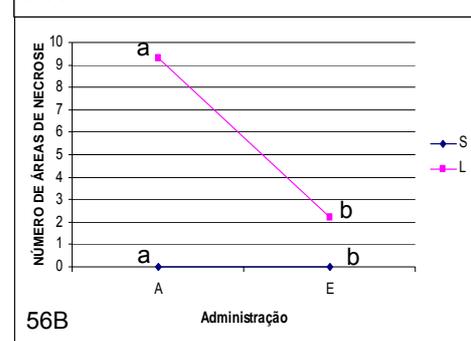
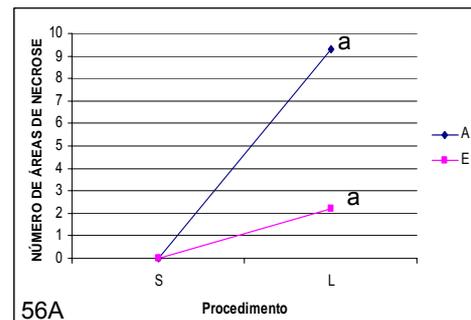
(LA + SA) > (LE + SE)  $p = 0,029$  ∴ *significativa*

\* Interação  $p < 0,001$  ∴ *significativa*

SNK – (LA > LE) / (LA > SA) / (LE > SE) / (SA ≈ SE)



**Figura 55 – Número de áreas de necrose – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.**



**Figura 56 – Número de áreas de necrose – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).**

**Conclusões:** A colestase aumentou o número de áreas de necrose. A vitamina E-TPGS atenuou esse efeito, diminuindo significativamente o número de necrose na presença de colestase.

**Tabela 33: INTENSIDADE DA PROLIFERAÇÃO DUCTAL – Estatística descritiva.** Media, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	0,00	1,00	1,00
Máximo	0,00	0,00	2,00	2,00
Mínimo	0,00	0,00	1,00	1,00
AV	0,00	0,00	1,00	1,00
DI	0,00	0,00	1,00	0,00
Média	0,00	0,00	1,40	1,10
DP	0,00	0,00	0,52	0,32
CV (%)	-	-	37,14	29,09

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

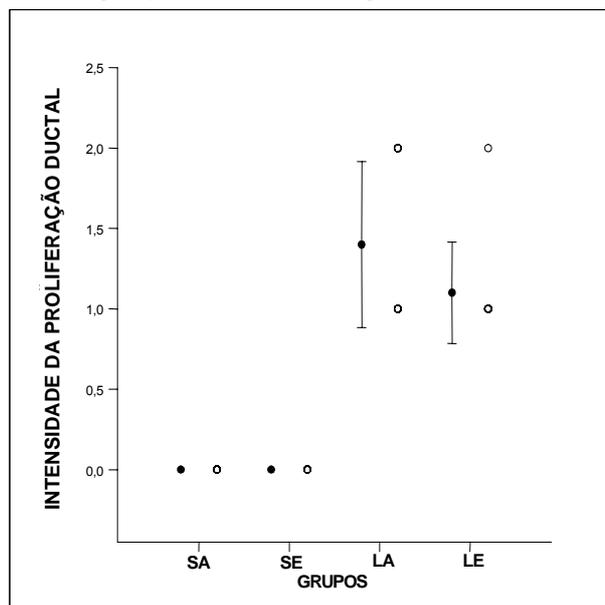
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 57 e 58)

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

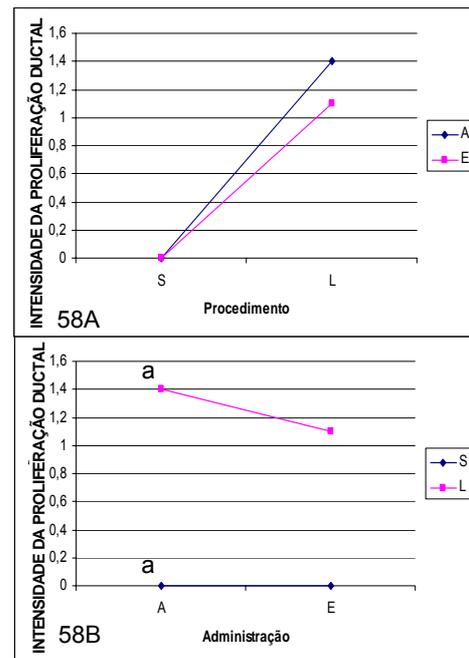
(LA + LE) > (SA + SE)  $p < 0,001$  ∴ *significativa*

(LA + SA) ≈ (LE + SE)  $p = 0,126$  ∴ *não significativa*

\* Interação  $p = 0,126$  ∴ *não significativa*



**Figura 57 – Intensidade da proliferação ductal –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 58 – Intensidade da proliferação ductal –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou a proliferação de ductos. A vitamina E-TPGS não interferiu nesse efeito.

**Tabela 34: INTENSIDADE DA ESTEATOSE HEPÁTICA – Estatística descritiva.** Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	0,00	1,00	1,00	0,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00
AV	0,00	1,00	1,00	0,00
DI	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	0,00	0,10	0,20	0,00
DP	0,00	0,32	0,42	0,00
CV (%)	-	320	210	-

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

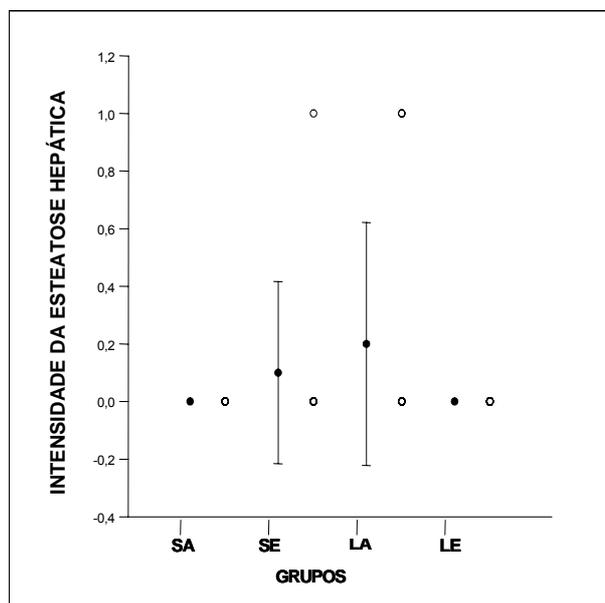
#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 59 e 60)

Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

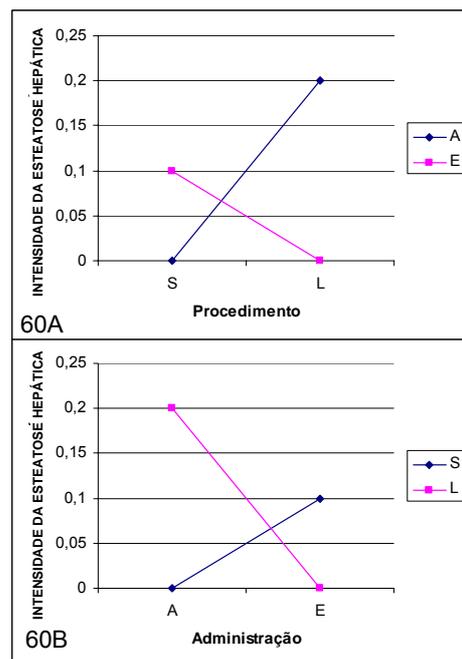
(LA + LE)  $\approx$  (SA + SE)  $p = 0,552$   $\therefore$  não significativa

(LA + SA)  $\approx$  (LE + SE)  $p = 0,532$   $\therefore$  não significativa

\* Interação  $p = 0,08$   $\therefore$  não significativa



**Figura 59 – Intensidade da esteatose hepática –** Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 60 – Intensidade da esteatose hepática –** Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** Tanto a colestase quanto a administração de vitamina E-TPGS não interferiram na intensidade de esteatose hepática.

**Tabela 35: INTENSIDADE DA DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA** – Estatística descritiva. Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	2,000	0,00	1,000
Máximo	1,00	2,00	1,00	2,00
Mínimo	0,00	1,00	0,00	0,00
AV	1,00	1,00	1,00	2,00
DI	1,00	1,00	0,00	0,00
Média	0,400	1,600	0,1000	1,100
DP	0,52	0,52	0,32	0,57
CV (%)	130,00	32,50	320,00	51,82

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

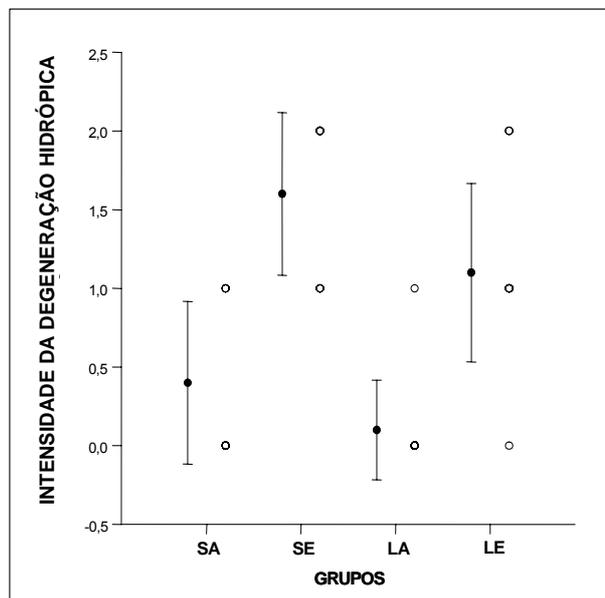
**ESTATÍSTICA COMPARATIVA** (ver figura 61 e 62)

Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

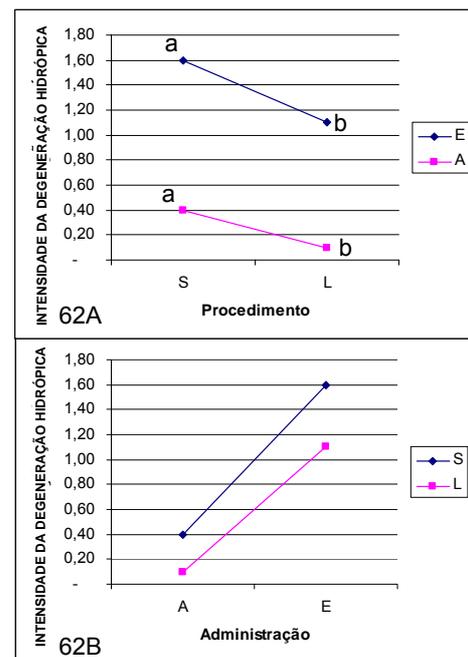
(LA + LE) > (SA + SE)  $p = 0,112$  ∴ não significativo

(LA + SA) < (LE + SE)  $p < 0,001$  ∴ *significativa*

\* Interação  $p = 0,522$  ∴ não *significativa*



**Figura 61 – Intensidade da degeneração hidrópica** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 62 – Intensidade da degeneração hidrópica** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** Não pudemos demonstrar efeito da colestase sobre a intensidade de degeneração hidrópica. A vitamina E-TPGS aumentou a intensidade de degeneração hidrópica, independentemente da colestase.

**Tabela 36: INTENSIDADE DA INFLAMAÇÃO** – Estatística descritiva. Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	0,00	0,00	1,00	1,00
Máximo	0,00	0,00	1,00	2,00
Mínimo	0,00	0,00	0,00	1,00
AV	0,00	0,00	0,00	1,00
DI	0,00	0,00	1,00	1,00
Média	0,00	0,00	0,90	1,40
DP	0,00	0,00	0,32	0,52
CV (%)	-	-	35,56	37,14

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 63 e 64)

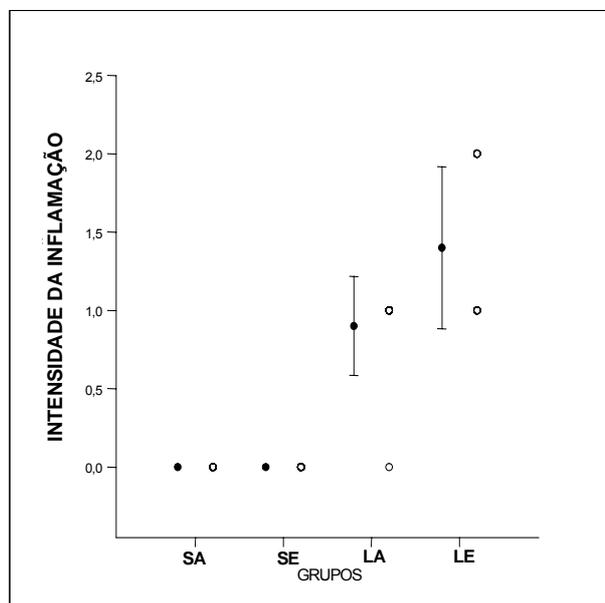
Os dados não passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância e foram substituídos pelo número de ordem crescente (rank). Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

$(LA + LE) > (SA + SE)$   $p < 0,001$  ∴ *significativa*

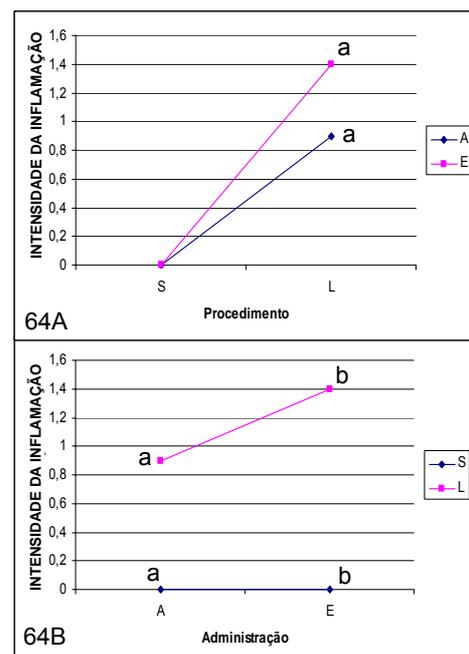
$(LA + SA) \approx (LE + SE)$   $p = 0,263$  ∴ *não significativa*

\* Interação  $p = 0,013$  ∴ *significativa*

SNK –  $(LA < LE) / (LA > SA) / (LE > SE) / (SA \approx SE)$



**Figura 63 – Intensidade da inflamação** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 64 – Intensidade da inflamação** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou a intensidade de inflamação. A vitamina E-TPGS acentuou esse efeito.

**Tabela 37: FREQUÊNCIA DE MITOSE** – Estatística descritiva. Média, valores máximos e mínimos, amplitude de variação (AV), distancia interquartis (DI)

Grupos	SA	SE	LA	LE
Mediana	10,500	3,000	15,000	4,500
Máximo	17,000	8,000	28,000	9,000
Mínimo	3,000	1,00	5,000	3,000
AV	6,00	2,00	11,00	1,00
DI	14,00	7,00	23,00	6,00
Média	9,300	3,400	14,000	5,000
DP	4,620	2,366	7,303	2,000
CV (%)	49,68	69,59	52,16	40,00

SA – Grupo sem colestase (operação simulada) e com administração de água. SE – Grupo sem colestase (operação simulada) com administração de vitamina E –hidromiscível. LA – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) e com administração de água. LE – Grupo com colestase (ligadura do colédoco) com administração de vitamina E –hidromiscível

#### ESTATÍSTICA COMPARATIVA (ver figura 65 e 66)

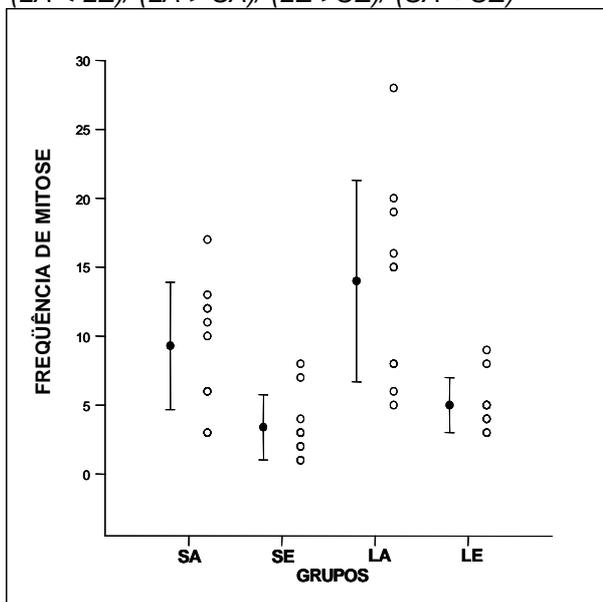
Os dados passaram nos testes de normalidade e igualdade de variância. Análise de variância com dois fatores (fator 1: presença ou não de colestase; fator 2: administração ou não de vitamina E- Hidromiscível) e comparação múltipla pelo método do Student-Newman-Keuls (S.N.K.).

$(LA + LE) > (SA + SE)$   $p < 0,001$  ∴ *significativa*

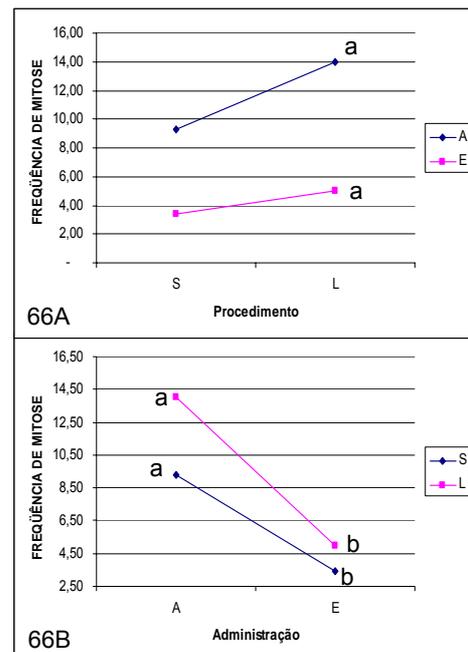
$(LA + SA) \approx (LE + SE)$   $p = 0,263$  ∴ *não significativa*

\* Interação  $p = 0,013$  ∴ *significativa*

$(LA < LE) / (LA > SA) / (LE > SE) / (SA \approx SE)$



**Figura 65 – Frequência da mitose** – Médias, desvios-padrão e valores individuais nos quatros grupos.



**Figura 66 – Frequência da inflamação** – Comparação entre as médias dos grupos fixando-se procedimentos (a) e administração (b). Médias seguidas da mesma letra diferem significativamente entre si pelo SNK ( $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** A colestase aumentou a frequência de mitoses. A vitamina E-TPGS atenuou esses efeitos.

### 4.3. RESUMO DOS RESULTADOS

**3) Terceira Hipótese:** A suplementação com vitamina E-TPGS influi sobre as lesões hepáticas decorrentes da colestase

#### ❖ FUNÇÃO HEPÁTICA

**Tabela 38:** Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva das variáveis da terceira hipótese.

VARIÁVEL	FATORES		INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)		
Tempo de Sono (min.)	(LA + LE) > (SA + SE) p < 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) > (SE + LE) p < 0,001 <b>significativo</b>	p = 0,034 <b>significativo</b> LA > LE p < 0,001 s. LA > SA p < 0,001 s. LE < SE p < 0,010 s. SA < SE p < n.s.	<b>Médias</b> SA=4,573 SE=3,984 LA=5,478 LE=4,406
Concentração Sérica de Albumina (g/dL)	(LA + LE) < (SA + SE) p = 0,004 <b>significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p = 0,002 <b>significativo</b>	p = 0,845 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=19,800 SE=30,650 LA=10,950 LE=20,600

**A)** Efeitos do procedimento, colestase ou não, independentemente da administração ou não da vitamina E-TPGS; **B)** Efeitos da Vitamina E-TPGS, administração ou não do TPGS, independentemente do procedimento: colestase ou não; **C)** Interação e comparação múltipla pelo S.N.K (Student Newman Keuls); **D)** = Análise descritiva; **DP** = Desvio-Padrão, **s** = significativo; **n.s.** = não significativo; **SA** = operação simulada com administração de água destilada; **SE** = operação simulada com administração de vitamina E-TPGS; **LA** = ligadura do ducto biliar comum com administração de água destilada; **LE** = ligadura do ducto biliar comum com administração de vitamina E-TPGS; **min** = minutos; **UI/L** = Unidades Internacionais por Litro; **g** = grama

## ❖ LESÃO HEPÁTICA

Tabela 39: Comparação entre efeitos da colestase e da Vitamina E-TPGS e comparação entre esses efeitos e análise descritiva de todas as variáveis.

VARIÁVEL	FATORES			
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)	INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
AST (UI/L)	(LA + LE) > (SA + SE) p= 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) ≈ (SE + LE) p = 0,081 <b>não significativo</b>	0,705 <b>não significativo</b> LA > SA p< 0,001s.	<b>Médias</b> SA=11,80 SE=9,200 LA=32,500 LE=28,500
ALT (UI/L)	(LA + LE) > (SA + SE) p= <0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) > (SE + LE) p = <0,001 <b>significativo</b>	p = 0,065 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=57,600 SE=43,100 LA=120,80 LE=78,300
Concentração Sérica de Globulinas (g/dL)	(LA + LE) > (SA + SE) p< 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) > (SE + LE) p<0,001 <b>significativo</b>	p = 0,016 <b>significativo</b> LA > LE p<0,001 s. LA > SA p<0,001 s. LE > SE p<0,001 s. SA > SE p<0,043 s.	<b>Médias</b> SA=3,620 SE=2,966 LA=6,229 LE=4,468
Concentração Sérica Vitamina E (mg/dL)	(LA + LE) < (SA + SE) p= <0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p = <0,001 <b>significativo</b>	p=<0,001 <b>significativo</b> LA < LE p<0,01 s. LA < SA p< 0,01s. LE < SE p<0,01 s. SA < SE p< 0,01 s.	<b>Médias</b> SA=8,205 SE=18,033 LA=1,170 LE=5,447
Concentração Sérica Vitamina A (mg/dL)	(LA + LE) < (SA + SE) p= <0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p = <0,001 <b>significativo</b>	p = 0,425 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=1,364 SE=1,759 LA=0,581 LE=1,092
Peso Freso do Fígado (100g de peso do animal)	(LA + LE) > (SA + SE) p= 0,005 <b>significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p = 0,045 <b>significativo</b>	p = 0,029 <b>significativo</b> LA < LE p<0,004 s. LA ≈ SA p=0,60 n.s. LE > SE p<0,001 s. SA ≈ SE p=0,89n.s.	<b>Médias</b> SA=16,100 SE=15,500 LA=18,400 LE=32,000
Conteúdo de Água do Fígado (g/100g animal)	(LA + LE) > (SA + SE) p< 0,001 <b>significativo</b>	(SA + LA) < (SE + LE) p < 0,001 <b>significativo</b>	p = 0,151 <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=11,700 SE=18,700 LA=18,200 LE=33,400

Tabela 39: Continuação

VARIÁVEL	FATORES			ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)	INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	
Conteúdo de Gordura Fígado (g/100g animal)	$(LA + LE) \approx (SA + SE)$ $p = 0,508$ não significativo	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p < 0,001$ significativo	$p = 0,619$ não significativo	Médias SA=11,600 SE=27,400 LA=15,100 LE=27,900
Peso Freso do Baço (g) (100g de peso do animal)	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p < 0,001$ significativo	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,384$ não significativo	$p = 0,009$ significativo LA < LE $p < 0,014$ s. LA $\approx$ SA $p = 0,19$ n.s. LE > SE $p < 0,001$ s. SA $\approx$ SE $p = 0,18$ n.s.	Média SA=16,600 SE=11,200 LA=21,900 LE=32,300
Conteúdo de Água do Baço (g/100g animal)	$(LA + LE) \approx (SA + SE)$ $p = 0,117$ não significativo	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p = 0,016$ significativo	$p = 0,064$ não significativo LA < LE $p < 0,05$ s. LA > SA $p < n.s.$ LE > SE $p < 0,05$ s. SA > SE $p < n.s.$	Médias SA=88,581 SE=91,500 LA=72,230 LE=92,89
Intensidade de Fibrose Hepática	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p < 0,001$ significativo	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,055$ não significativo	$p = 0,015$ significativo LA > LE $p < 0,001$ s. LA > SA $p < 0,001$ s. LE > SE $p < 0,001$ s. SA $\approx$ SE $p < 1,00$ n.s.	Médias SA=0,000 SE=0,000 LA=1,700 LE=1,100
Número de Áreas de Necrose	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p < 0,005$ significativo	$(SA + LA) > (SE + LE)$ $p = 0,029$ significativo	$p < 0,01$ significativo LA > LE $p < 0,001$ s. LA > SA $p < 0,001$ s. LE > SE $p < 0,003$ s. SA $\approx$ SE $p = 1,00$ n.s.	Médias SA=0,000 SE=0,000 LA=9,300 LE=2,200
Intensidade de Proliferação Ductal	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p < 0,001$ significativo	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,126$ não significativo	$p = 0,126$ não significativo	Médias SA=0,000 SE=0,000 LA=1,400 LE=1,100
Intensidade de Esteatose Hepática	$(LA + LE) \approx (SA + SE)$ $p = 0,552$ não significativo	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,532$ não significativo	$p = 0,08$ significativo	Médias SA=0,000 SE=0,1000 LA=0,200 LE=0,000

Tabela 39: Continuação

VARIÁVEL	FATORES		INTERAÇÃO/ COMPARAÇÃO MÚLTIPLA (S.N.K.) (C)	ANÁLISE DESCRITIVA (D)
	PRESENÇA OU NÃO DE COLESTASE (A)	TIPO DE DIETA (B)		
<b>Intensidade Degeneração Hidrópica</b>	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p = 0,112$ <b>não significativo</b>	$(SA + LA) < (SE + LE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$p = 0,522$ <b>significativo</b>	<b>Médias</b> SA=0,400 SE=1,600 LA=0,100 LE=1,100
<b>Intensidade de Inflamação</b>	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) \approx (SE + LE)$ $p = 0,263$ <b>não significativo</b>	$p = 0,013$ <b>significativo</b> LA < LE $p < 0,001$ s. LA > SA $p < 0,001$ s. LE > SE $p < 0,001$ s. SA $\approx$ SE $p = 1,00$ n.s.	<b>Médias</b> SA=0,000 SE=0,000 LA=0,900 LE=1,400
<b>Frequência de Mitose</b>	$(LA + LE) > (SA + SE)$ $p = 0,013$ <b>significativo</b>	$(SA + LA) > (SE + LE)$ $p < 0,001$ <b>significativo</b>	$p = 0,745$ <b>não significativo</b>	<b>Médias</b> SA=0,905 SE=0,438 LA=1,087 LE=0,671

**A)** Efeitos do procedimento, colestase ou não, independentemente da administração ou não da vitamina E-TPGS; **B)** Efeitos da Vitamina E-TPGS, administração ou não do TPGS, independentemente do procedimento:colestase ou não; **C)** Interação e comparação múltipla pelo S.N.K (Student Newman Keuls); **D** = Análise descritiva; **s** = significativo; **n.s.** = não significativo; **SA** = operação simulada com administração de água destilada; **SE** = operação simulada com administração de vitamina E-TPGS; **LA** = ligadura do ducto biliar comum com administração de água destilada; **LE** = ligadura do ducto biliar comum com administração de vitamina E-TPGS; **min** = minutos; **UI/L** = Unidades Internacionais por Litro; **g** = grama.

## **5.0. DISCUSSÃO**

## 5.1. ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS

No nosso experimento, a colestase associou-se à diminuição do ganho de peso, do peso fresco da carcaça, da ingestão alimentar, do aproveitamento nutricional e do balanço nitrogenado.

O prejuízo do estado nutricional durante a colestase está relacionado com diminuição do aproveitamento nutricional pela má absorção, pela retenção de ácidos biliares tóxicos e pela liberação de citocinas. Esse mecanismo pode ser explicado pela lesão hepatocítica como um todo que resulta na diminuição do transporte e armazenamento de nutrientes (BAVDEKAR et al., 2002), além da diminuição da síntese hepática do fator de crescimento semelhante à insulina - IGF-I (*Insulin like growth factor-I* IGF-I) (AN et al., 2001; KATZ et al., 1991) e assim resistência ao hormônio de crescimento (GH), resultando, desta forma, em déficit de crescimento (QUIRK et al., 1994; UDEN et al., 2002).

O presente estudo mostrou que a administração de vitamina E-TPGS atenuou e corrigiu os seguintes efeitos da colestase: diminuição da ração ingerida, do aproveitamento nutricional, do ganho de peso, do peso fresco da carcaça, do conteúdo de gordura da carcaça e do balanço nitrogenado. Não encontramos na literatura o efeito da vitamina E-TPGS sobre esses indicadores nutricionais.

A correção parcial dos efeitos da colestase estudados pode ser devida a um possível efeito hepatoprotetor (veja abaixo no item 5.4.5.) e/ou nos outros órgãos e tecidos. Desta forma a melhora do estado nutricional, pode ser decorrente do aumento da ingestão protéico-calórica, da síntese protéica e da melhora da absorção de lipídios, com aumento do depósito de nitrogênio na carcaça resultando em balanço nitrogenado positivo.

Em animais controle a vitamina E-TPGS aumentou significativamente o conteúdo de nitrogênio e o de gordura da carcaça. Esses resultados levantam a hipótese de que a suplementação de vitamina E-TPGS possa ter efeito positivo na nutrição de crianças em crescimento.

## **5.2. METABOLISMO LIPÍDICO**

A ligadura e ressecção do ducto biliar pode ser usada como modelo de alterações do metabolismo lipídico que ocorre na atresia biliar (DE VRIESE et al., 2001). Em nosso trabalho, a colestase aumentou os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, LDL-colesterol e VLDL-colesterol. Resultados semelhantes foram encontrados por Battochio e colaboradores (2005), que estudando ratos submetidos a ligadura e ressecção do ducto biliar comum, observaram aumento significativo dos níveis séricos de colesterol total e de triacilgliceróis durante a colestase.

Essas alterações podem ser devida a síntese hepática aumentada, a diminuição na secreção biliar e alterações das lipoproteínas (LDL, VLDL).

A vitamina E-TPGS acentuou o aumento dos níveis de triacilgliceróis e VLDL-colesterol no grupo com colestase. Estes resultados podem ser explicados pela ação hepatoprotetora da vitamina E-TPGS, evitando a queda na concentração sérica de colesterol causada pela diminuição da sua síntese, o que ocorre em estágios avançados da doença hepática crônica, e por ação estimuladora da síntese de triacilgliceróis na colestase.

Em animais não colestáticos a vitamina E-TPGS diminuiu significativamente os níveis séricos de colesterol total, VLDL-colesterol e triacilgliceróis. Vários autores vêm demonstrando efeitos benéficos da vitamina E sobre o metabolismo lipídico, através do controle da hipercolesterolemia em animais (MINHAJUDDIN et al., 2005). Stampfer e colaboradores (1993), observaram que o consumo de 200UI de vitamina E foi associado à redução de 40% no risco de coronariopatias e que o consumo de 100UI diárias reduziu a progressão da doença coronariana já existente, estudo prospectivos, realizado com 120.000 pessoas. Lucas e colaboradores (2006), observaram que suplementação via oral de vitamina E, na dosagem de 75 UI/Kg, diminui os níveis totais de lipídios hepáticos, em ratas ovariectomizadas que apresentavam dislipidemia. Esses resultados foram atribuídos à ação antioxidante da vitamina E, que protege a LDL (O'KEEFE, et al., 1996).

A diminuição dos níveis séricos de colesterol total, colesterol-VLDL e triacilgliceróis, nos controles após a suplementação

com vitamina E-TPGS, pode sugerir aplicação na profilaxia da hipercolesterolemia e da hipertrigliceridemia no adulto.

### **5.3. FUNÇÃO HEPÁTICA**

#### **5.3.1. TEMPO DE SONO APÓS PENTOBARBITAL**

O teste do tempo de sono após pentobarbital tem sido utilizado para avaliar a eficiência funcional das células hepáticas em muitos modelos experimentais (VAN PYVELCE, 1989, GILIANI & JANBAZ, 1995, BASTIEN et al., 2000, MONTALO, 2001), incluindo o modelo de colestase crônica por obstrução e ressecção do ducto biliar comum em ratos jovens (PASSONI, 2004, BATTOCHIO, 2005).

Em nosso estudo a colestase associou-se a aumento significativo do tempo de sono após pentobarbital. Esse aumento é resultado da diminuição na atividade de desintoxicação hepática pelo citocromo P450 *in vivo* (GHEZZI et al., 1986; CHEN et al., 1995, CHEN et al., 1998; MORGAN et al., 2002), em particular, pela diminuição da isoenzima 3A4, em humanos e 3A2, em ratos. Ambas envolvidas no metabolismo hepático do pentobarbital (NELSON, 1999). Essa diminuição é conseqüente à retenção de substâncias tóxicas secretadas na bile, especialmente os ácidos biliares, detergentes (ácido desoxicólico) e ácidos biliares hidrofóbicos colestáticos (ácidos biliares monohidroxilados como o ácido litocólico e 3 $\beta$  hidroxi 5 $\Delta$  colenólico (PAOLINI et al., 1999;

AGUERO et al., 2001) e à liberação hepática de citocinas (mediadores solúveis produzidos pelas células de Küpffer) durante o desenvolvimento da doença (NICHOLSON & RENTON, 2002)).

A vitamina E-TPGS diminuiu o tempo de sono durante a colestase. Sugerimos que a vitamina E-TPGS mantém a função do citocromo P450 por proteção do hepatócito.

Em animais controle sem colestase a vitamina E-TPGS também diminuiu o tempo se sono. Nossos resultados sugerem que a vitamina E-TPGS estimula a produção do citocromo P450. Na literatura a vitamina E-TPGS está descrita como intensificador de absorção de muitos componentes e relaciona-se ao aumento da biodisponibilidade de drogas (ARGAO et al., 1992, YOUK et al., 2005, RAJEBAHADUR, 2006).

### **5.3.2. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ALBUMINA**

A colestase associou-se a diminuição significativa dos níveis séricos de albumina. Gouma e colaboradores (1986) observaram, em animais com colestase obstrutiva experimental por ligadura e ressecção do ducto biliar comum (LRDB), diminuição significativa dos níveis de albumina e relacionaram-na com dano ou destruição. Três processos estão dinamicamente relacionados ao nível plasmático de albumina: síntese, distribuição e degradação (DICHI et al., 1991). A doença hepática crônica pode ser a causa do desequilíbrio desses

processos, principalmente por afetar a síntese e a distribuição dessa proteína (CHIU et al., 2000).

HORIE e colaboradores (1998) relacionaram a hipoalbuminemia à ausência de aumento compensatório na síntese de albumina, à lesão hepática, à diluição por aumento do volume plasmático e à desnutrição decorrente da má absorção e da lesão hepática (HORIE et al., 1998).

A vitamina E-TPGS elevou os níveis séricos de albumina durante colestase. Esse efeito pode ser decorrente de seu efeito hepatoprotetor, diminuindo o dano hepático e promovendo síntese e distribuição de albumina.

Em animais controle sem colestase a vitamina E-TPGS elevou os níveis séricos de albumina. Na ausência de colestase talvez a vitamina E interfira em um ou mais dos processos controladores do nível de albumina sérico: síntese, distribuição e degradação.

## 5.4. LESÃO HEPÁTICA

### 5.4.1. ATIVIDADES SÉRICAS DE ALT E AST

A colestase elevou significativamente os níveis séricos de ALT e AST. Resultados similares foram observados na literatura em outros estudos experimentais: colestase por LRDB em ratos adultos (PARK et al., 2000, DEMIRBILEK et al., 2006a), colestase induzida por endotoxinas (LECHNER & VELASQUEZ, 1998), colestase associada à nutrição parenteral total em ratos adultos (LASCALA et al., 1993, ZAHAVI, et al., 2000) e colestase por  $\alpha$ -naftil isotilcianato –ANIT (NEGHBAB & STACELY, 1996, KONGO et al., 1999).

Em humanos a colestase é acompanhada de elevação significativa de ALT e AST, sendo marcadores de velocidade da lesão hepatocelular (LECHNER & VELASQUEZ, 1998, SHERLOCK & DOOLEU, 2002). O aumento da atividade das aminotransferases resulta de alterações na permeabilidade da membrana celular e dano ou destruição dos tecido hepatócitos (PRATT & KAPLAN, 1998) e está relacionado com a velocidade em que está ocorrendo a necrose hepatocítica num determinado momento (DAVERN & SCHARSCHMIDT, 2002).

A vitamina E-TPGS diminuiu significativamente os níveis de ALT na colestase. Esse resultado pode ser decorrente do efeito

hepatoprotetor da vitamina E-TPGS, com diminuição da velocidade de necrose dos hepatócitos.

Em animais controle sem colestase a vitamina E-TPGS diminuiu os níveis de ALT. Esse resultado pode ser decorrente da diminuição da fragilidade da membrana plasmática.

#### **5.4.2. CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLOBULINAS**

A colestase aumentou os níveis séricos de globulinas. Esse aumento, principalmente das imunoglobulinas, está relacionado à hipertensão portal, que compromete a integridade da mucosa gastrointestinal, por shunts porto-sistêmicos, diretamente para circulação sistêmica, desta passam ao sistema imunológico, estimulando a produção de imunoglobulina (DEITH et al., 1990, WELSH et al., 1998). Este mecanismo foi mostrado pelo trabalho de Keraan & Meyers (1974), que estudando ratos com shunt-portocava, observaram aumento das globulinas séricas, especialmente das imunoglobulinas.

A vitamina E-TPGS diminuiu os níveis séricos de globulina durante a colestase. Esse efeito pode ser decorrente de seu efeito hepatoprotetor, diminuindo a fibrose e a resistência da circulação portal.

No grupo controle a vitamina E-TPGS diminuiu os níveis séricos de globulinas. Esse efeito sugere que a suplementação com a mesma possa estimular a produção de imunoglobulinas e/ou das lipoproteínas.

### 5.4.3. CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE VITAMINA A E E

A colestase diminuiu significativamente os níveis de vitamina E sérica. Este resultado está relacionado com o prejuízo na absorção, decorrente da ausência de ácidos biliares na luz intestinal, no aproveitamento e na exportação de vitamina E para os outros tecidos (DIMITROV et al., 1996), decorrentes da retenção de ácidos biliares tóxicos e liberação de mediadores solúveis e espécies reativas de oxigênio (COOP et al., 1999, SCHIMPL et al., 2000).

A vitamina E-TPGS aumentou os níveis séricos de vitamina E na presença de colestase. Nossos achados estão de acordo com os trabalhos de Sokol e colaboradores (1994) e Socha e colaboradores (1997), que observaram normalização dos níveis séricos de vitamina E após a suplementação de vitamina E-TPGS na dosagem de 20 a 25UI/Kg por dia. A correção dos baixos níveis de vitamina E pode não depender apenas da sua suplementação, mas também de sua ação na proteção hepática (SOKOL, et al., 1994, SOCHA, et al., 1997) .

A efetividade da suplementação de vitamina E-TPGS foi confirmada pelo aumento dos níveis séricos de vitamina E no grupo controle sem colestase.

A colestase diminuiu os níveis séricos de vitamina A. Esse resultado pode ser atribuído ao comprometimento hepático, à diminuição da ingestão alimentar e ao prejuízo no transporte sérico pela RBP, além

da má absorção intestinal. O prejuízo na síntese hepática da proteína transportadora do retinol – RBP (*retinol binding protein*) é devido à lesão do hepatócito, e a diminuição na capacidade de armazenamento de vitamina A é devida à ativação das células estreladas o que diminui as gotículas de gordura que armazenam a vitamina A (MOBARHAN et al., 1981, KINNMAN et al., 2002, JAESCHKE et al., 2002).

A vitamina E-TPGS aumentou os níveis séricos de vitamina A durante a colestase. Este resultado pode ser explicado pelo papel hepatoprotetor da vitamina E, diminuindo, desta forma, a produção de espécies reativas de oxigênio e a lesão hepatocelular com conseqüente aumento de retinol sanguíneo.

Em animais controles sem colestase a vitamina E-TPGS aumentou os níveis séricos de vitamina A. Esse resultado pode ser explicado pela ação antioxidante da vitamina E, que evita a oxidação da vitamina A na luz intestinal (CANTAROW & SCHEPARTZ, 1957).

#### **5.4.4. PESO E COMPOSIÇÃO DO FÍGADO E DO BAÇO**

A colestase aumentou o peso fresco do fígado e do baço. O aumento do peso do fígado reflete a deposição de tecido conjuntivo, a formação de células degenerativas e proliferação ductal (WASSER & TAN, 1999). Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos de ALLER e colaboradores (1993) e Battochio e colaboradores (2005), que

estudaram ratos submetidos a LRDB, e também observaram aumento do fígado desses animais. O aumento do peso fresco do baço pode ser explicado pela congestão do mesmo secundária à hipertensão portal.

A colestase aumentou o conteúdo de água do fígado. Segundo Nagano e colaboradores (1994) e Takahashi (1996) a colestase experimental em ratos causa disfunção dos mitocôndrios com diminuição da capacidade fosforilativa, com diminuição da produção de ATP. Além disso há prejuízo na função da ATPase dependente de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{K}^+$  das membranas baso-laterais dos hepatócitos e aumento no conteúdo de água do hepatócito, causando edema intracelular. Outra possível explicação é pela presença de lesão hepática que prejudica o catabolismo de aldosterona, levando ao aumento da reabsorção tubular de  $\text{Na}^+$  e assim edema tissular (ABRAHAM & SCHRIER, 1994, PENA, 1995). A hipoalbuminemia observada, nos animais com colestase, também pode contribuir para a formação do edema na colestase.

A vitamina E-TPGS acentuou o aumento do peso fresco, do conteúdo de água e do conteúdo de gordura do fígado, e do peso fresco do baço. Não encontramos na literatura referências a esses efeitos.

Em animais controles sem colestase a vitamina E-TPGS aumentou o conteúdo de água do fígado.

#### 5.4.5. LESÃO HISTOPATOLÓGICA

A colestase associou-se à fibrose portal, à proliferação ductal, à necrose, à inflamação e ao aumento da frequência de mitose. Esses achados têm sido confirmados por trabalhos que estudaram modelo de cirrose biliar secundária a ligadura do ducto biliar comum em ratos jovens (PINZANI & MILANI, 1998, WASSER & TAN, 1999, SANTOS, 2005, BATTOCHIO, 2005).

O estresse oxidativo, em particular a peroxidação lipídica, pode induzir a síntese de colágeno na colestase experimental (MURIEL & MORENO, 2004) e, dessa forma, produzir fibrose hepática. A diminuição de vitamina A estimula a ativação das células de Ito em miofibroblastos, que intensifica a deposição de fibrose (FRIEDMAN, 2000; CHEN & ZHANG, 2003).

A proliferação de ductos pode ser explicada pelo estresse oxidativo, na colestase, que ativa o Fator Nuclear Kappa B (NF-KappaB) (BYUN et al., 2002). O NF-KappaB estimula a transcrição dos genes do TNF- $\alpha$ , que por sua vez estimula a proliferação ductal (LIU, 2005). A ativação do NF-KappaB, também, foi associada ao aumento do processo inflamatório durante a colestase obstrutiva crônica por ligadura e ressecção do duto biliar comum (DEMIRBILEK et al., 2006b).

O aumento do número de mitoses na colestase está relacionado com regeneração hepatocítica, decorrente do aumento da

intensidade de necrose. Aggerbeck e colaboradores (1983), observaram aumento do número de mitoses em ratos colestáticos após LRDB.

A vitamina E-TPGS diminuiu significativamente a intensidade de fibrose portal, o número de áreas de necrose e a intensidade de mitose, na presença de colestase. Esses resultados podem ser decorrentes da ação hepatoprotetora da vitamina E-TPGS, que diminui a produção de substâncias reativas de oxigênio com conseqüente diminuição do estresse oxidativo. A diminuição da freqüência de mitose relacionou-se com a diminuição da intensidade de necrose e da regeneração hepática. Na literatura não foram encontrados relatos sobre o efeito da vitamina E-TPGS sobre as lesões hepáticas encontradas na histologia hepática.

A vitamina E-TPGS, na colestase, não interferiu significativamente na intensidade de esteatose hepática e acentuou a inflamação presente na colestase. Talvez exista, nesta situação, um efeito pró-inflamatório da vitamina E.

A vitamina E-TPGS intensificou a degeneração hidrópica tanto na presença quanto na ausência de colestase. A explicação do efeito da vitamina E-TPGS necessita ser confirmado e exigirá novas pesquisas.

## **6.0. CONCLUSÕES**

▲ A administração de vitamina E-TPGS:

- Influuiu sobre as alterações nutricionais decorrentes da colestase crônica obstrutiva da seguinte maneira: atenuando a diminuição da ingestão alimentar, corrigindo a diminuição do aproveitamento nutricional, do peso fresco da carcaça, do conteúdo de nitrogênio e de gordura da carcaça e do ganho de peso; e atenuando a diminuição do balanço nitrogenado.
- influenciou sobre o metabolismo lipídico, aumentando os níveis séricos de triacilgliceróis e de VLDL-colesterol.
- influenciou sobre as lesões e disfunções hepáticas decorrentes da colestase crônica obstrutiva da seguinte maneira: encurtando o aumento do tempo de sono, atenuando a diminuição da síntese de albumina e dos níveis séricos de vitamina A, atenuando o aumento dos níveis séricos de globulina e da atividade da alanina aminotransferase (ALT), diminuindo o aumento da regeneração hepática (medida pelo número de mitoses), e diminuindo a intensidade da fibrose e da necrose (número de áreas de necrose).

- ▲ A administração de vitamina E-TPGS na ausência de colestase influiu:
  - no estado nutricional, com aumento da ingestão alimentar e do conteúdo de nitrogênio e de gordura da carcaça.
  - no metabolismo lipídico com diminuição das concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total e VLDL-colesterol.
  - sobre o tempo de sono após pentobarbital, encurtando-o.
  - sobre os níveis séricos de albumina, de vitamina A e E, elevando-os e sobre os níveis séricos de globulinas, diminuindo-os e provocando degeneração hidrópica.
  
- ▲ Portanto, a suplementação de vitamina E-TPGS pode ser uma medida efetiva no tratamento da colestase do recém-nascido e do lactente jovem.

## **7. O. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABRAHAM, W.T., SCHRIER, R.W. Body fluid volume regulation in health and disease. *Adv. Intern. Med.*, v.39, p.23-47, 1994.
- AGGERBECK, M., et al. Adrenergic regulation of glycogenolysis in rat liver after cholestasis. Modulation of the balance between alpha 1 and beta 2 receptors. *J. Clin. Invest.*, v.71, p.476-86, 1983.
- AGUERO, M.R., FAVRE, C., RODRIGUEZ-GARAY, E.A. Inhibitory effect of short-term bile duct ligation on hepatic cytochrome P450 of bile acid-depleted. *Pathobiology*, v.69, p.30-5, 2001.
- AKERBOOM, T., et al. Cholestasis and changes of portal pressure caused by chlorpromazine in the perfused rat liver. *Hepatology.*, v.13, p.216-21, 1991
- ALAGILLE, D.H., et al. Extrahepatic biliary atresia. *Hepatology*, v.4, p.7S-10S, 1984
- ALEMAN, M.R., et al. Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine*, v.19, p.21-6, 2002.
- ALLER, M.A., et al. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Gastroenterol.*, v.28, p.10-14, 1993.
- AN, Y., BIE, P., LIU, B. Clinical study on the changes of growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in patient with obstructive jaundice. *Chung Hua I Hsuch Tsa Chih*, v.81, p.921-3, 2001.

- ANALAY, H., et al. Effects of vitamin E on neutrophil phagocytosis during experimental obstructive jaundice. *Hepatogastroenterol.*, v.47, p.355-8, 2000.
- ÂNGULO, P., et al. Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis: prevalence, severity and prediction of progression. *J. hepatol.*, v.29, p.729-35, 1998.
- ARGAO, E.A., et al. d-Alpha-tocopheryl polyethylene glycol-1000 succinate enhances the absorption of vitamin D in chronic cholestatic liver disease of infancy and childhood. *Pediatr. Res.*, v.31, p.146-50, 1992
- ARNAUD, I., et al. Simultaneous determination of retinal,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.572, p.103-16, 1991.
- ARRESE, M., YANAN, M.A., SUCHY, F. Hepatobiliary transport: molecular mechanisms of development and cholestasis. *Pediatr. Res.*, v.44, p.141-7, 2001.
- BACHMAIR, F., et al. Studies on structure-activity relationships of retinoic acid receptor ligands by means of molecular modeling. *Vitam. Horm.*, v.59, p.159-215, 2000.
- BADLEY, B.W.D., et al. Diminished micellar phase lipid in patients with chronic nonalcoholic liver disease and steatorrhea. *Gastroenterology*, v.58, p.781, 1970.
- BALISTRERI, W.F. Cholestasis. In: BEHRMAN, R.E, KLIEGMAN, R., JENSON, H.B. Textbook of pediatrics. 16 ed. Philadelphia: Saunders, 2000, p.1203-7.

- BARR, V.A., HUBBARD, A.L. Newly synthesized hepatocyte membrane proteins are transported in transcytotic vesicles in the duct-ligated rat. *Gastroenterology.*, v.105, p.554-571, 1993
- BARR, L.H., et al. Essential fatty acid deficiency during total parenteral nutrition. *Ann.Surg.*, v.193, p.304-11, 1981.
- BAST, A., HAENEM, G.R.M., DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J.Med.*, v.91, p.2S-13S, 1991.
- BASTIEN, M.C., LEBLOND, F., PICHETTE, V., VILLENEUVE, J.P. Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.78, p.912-9, 2000.
- BATTOCHIO, A.P.R., SANTOS, A.G., SILVA, C.R.M., SANTOS, A.R., COELHO, C.A.R. Adaptação do modelo experimental de colestase extra-hepática em ratos jovens. *Acta. Cir. Bras.*, v.19, p.70-3, 2004
- BATTOCHIO, A.P., et al. Water-soluble extract of *Coleus barbatus* modulates weight gain, energy utilization and lipid metabolism in secondary biliary cirrhosis: an experimental study in young rats. *Acta Cir. Brás.*, v.20, p.229-236, 2005
- BATTOCHIO, A.P.R. *Efeito hepatoprotetor do extrato aquoso de Coleus barbatus (Boldo nacional) na hepatopatia causada por colestase obstrutiva – estudo experimental em ratos jovens.* (Tese de Doutorado em Pediatria – Área de concentração: Pediatria – Faculdade de Medicina de Botucatu), 2005
- BAVDEKAR, A., BHAVE, S., PANDIT, A. Nutrition management in chronic liver disease. *Indian J. Pediatr.*, v.69, p.427-31, 2002.

- BEN-ARI, Z., et al. Alterations in serum leptin in chronic liver disease. *Dig. Dis. Sci.*, v.47, p.183-9, 2002.
- BENZ, C., et al. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile-acid-induced apoptosis and cytolysis in rat hepatocytes. *J. Hepatol.*, v.28, p.99-106, 1998.
- BERGASA, N.V. Gabapentin in patients with the pruritus of cholestasis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology.*, v.44, p.1317-23, 2006.
- BEZERRA, J. Colestase neonatal. In: FERREIRA, C.T., CARVALHO, E., SILVA, L. Gastroenterologia e Hepatologia. São Paulo: Atheneu, 1996. p.145-53
- BLOMHOFF, R., WAKE, K., PERISIUSOIDAL STELLATE CELLS OF THE LIVER: Important roles in retinol metabolism and fibrose. *FASEB J.*, v.5, p.271-7, 1991.
- BLOMSMA, M.C. et al. Insulin-like growth factor-I in liver cirrosis. *J. Hepatol.*, v.27, p.1133-8,1997.
- BOLDER, U., et al. Hepatocyte transport of bile acids and organics anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion. *Gastroenterol.*, v.112, p.214-25, 1997.
- BOOK, L.S. Fat soluble vitamins in cholestasis. In: ADCOCK, EW III, LESTER R., (Eds.). *Neonatal cholestasis: causes, syndromes, therapies. Report of the 87th Ross Conference on Pediatric Research.* Columbus: Ross Laboratories, p.104-10, 1984.

- BOSSARD, R., et al. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.2714-20, 1993.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R., TRABER, G. M. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.*, v.13, p.1145-55, 1999.
- BUCUVALAS, J.C., et al. Resistance to the growth promoting and metabolic effects of hormone in children with chronic liver disease. *J. Pediatr.*, v.3, p.397-402, 1990.
- BURTON G. W., JOICE, A., INGOLD, K.U. Is Vitamin E the only lipid soluble chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.*, v.222, p.281-90, 1983.
- BYUN, M.S., et al. Dual effect of oxidative stress on NF-Kappa $\beta$  activation in hela cells. *Exp. Mol. Med.*, v.34, p.332-9, 2002.
- CAMERON, G.R., OAKLEY, C.L. Ligation of the common bile duct. *J. Pathol. Bacteriol.*, v.35, p.769-99, 1932.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE 1980-1984. Guide the care and use of experimental animals. Vols. 1 and 2. Ottawa, Ontario: Canadian Council on Animal Care.
- CANTAROW, S., SCHEPARTZ, B. Vitamins. In: CANTAROW, S., SCHEPARTZ, B. *Biochemistry*. Philadelphia, 2.ed. 1957, p.127-135.

- CARAMORI, C.A. Comparação entre dietas com diferentes fontes de gordura quanto aos efeitos sobre a nutrição e a lesão hepática na Colestase obstrutiva: estudo experimental em ratos jovens. (Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição – Faculdade de Medicina de Botucatu), 2002.
- CARDOSO, A.L., et al. Caracterização nutricional de crianças com colestase crônica. *J. Pediatr.*, v.73, p.43-50, 1997.
- CARNIELLI, V.P., et al. The very low birth premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. *Pediatr. Res.*, v.40, p.169-74, 1996.
- CAUDURU, S.M. Atresia biliar extra-hepática: métodos diagnósticos. *J. Pediatr.*, v.79, p.107-14, 2003.
- CHAPCAHP, P. Atresia das vias biliares e outras alterações dos ductos biliares extra-hepáticos. In: GAYOTTO, I.C.C., ALVES, V.A.F. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu, 2001, p.267-81.
- CHEN, A., ZHANG, L. The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor. *J. Biol. Chemistr.*, v.278, p.23381-89, 2003.
- CHEN, J., et al. Downregulation of Male-Specific Cytochrome P450s 2C11 and 3A2. In: Bile Duct-ligated Males Rats: Importance to Reduced Hepatic Content of Cytochrome P450 in Cholestasis. *Hepatology.*, v.22, p.580-7, 1995.

- CHEN, J., et al. Effects bile duct-ligated hepatic expression of female-specific CYP 2C12 in males and female rats. *Hepatology.*, v.28, p.624-30, 1998.
- CHIN, S.E., et al. The nature of malnutrition in children with end-stage disease awaiting orthotopic liver transplantation. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.55, p.164-8, 1992
- CHIU, K.W., et al. Albumin gradient and portal vein velocity in severe viral hepatitis patients complicated with ascites. *Hepatogastroenterol.*, v.47, p.1700-2, 2000.
- CHONGSRISAWAT, V., et al. Bone density and 25-hydroxyvitamin D level in extrahepatic biliary atresia. *Pediatr. Surg. Int.*, v.17, p.604-8, 2001.
- CLANDININ, MT., et al. Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues. *Early. Hum. Dev.*, v.5, p.355-60, 1981.
- COBEA (Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Manual para técnica em bioterismo, 1996.
- COHEN, S.A., SIEGEL, J.H. Biliary disorders in AIDS. *Pract. Gastroenterol.*, v.17, p.10-8, 1993.
- COPP, R.P., WISNIEWSKI, T., HENTATI, F. et al. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain. Res.*, v.20, p.80-7, 1999.
- DAHMS, B.B., BOYD, T., REDLINE, R.W. Severe perinatal liver disease associated with fetal thrombotic vasculopathy. *Pediatr. Dev. Pathol.*, v.5, p.80-5, 2002.

- DAVERN, T.J., SCHARSCHMIDT, B.F. Biochemical liver test. In: FELDMAN M., FRIEDMAN L.S., SLEISENGER, M.H. Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management. 7.ed. Philadelphia: Saunders, 2002. p.1393-1401.
- DEITCH, E.A., et al. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am. J. Surg.*, v.159, p.79-84, 1990.
- DELANGE, J.R, GLAZER, N.A. Bile acids: oxidants or enhancers of peroxidation depending on lipid concentration. *Arhc. Biochem. Biophys.*, v.276, p.19-35, 1990.
- DEMIRBILEK, S., et al. Fluvastatin reduced liver injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *Pediatr. Surg. Int.*, v.4, 2006a.
- DEMIRBILEK, S., et al. The NK-KappaB inhibitors attenuate hepatic injury in bile duct ligated rats. *Pediatr. Surg. Int.*, v.22, p.655-63, 2006b.
- DE VRIESE, S.R., et al. Fat absorption and metabolism in bile duct ligated rats. *Ann. Nutr. Metab.*, v.45, p.209-16, 2001.
- DICH, I., et al. Estado nutricional de pacientes portadores de cirrose hepática. Relação entre a gravidade da doença com a piora nutricional avaliada por indicadores antropométricos e bioquímicos. *Rev. Bras. Nutr. Clin.*, v.6, p.29-33, 1991.
- DIMITROVI N. V., et al. Plasma  $\alpha$ -tocopherol concentrations after supplementation with water – and fat-soluble vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.64, p.329-35, 1996.
- DONAT, A.E., et al. Atresia de vías biliares: estudio clínico retrospectivo. *An.Pediatr. (Barc)*, v.60, p.323-9,2004.

- DUFOUR, R.D., et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chim.*, v.46, p.2027-49, 2000.
- EASTMAN CHEMICAL COMPANY. *Vitamin E-TPGS NF: properties and applications*. Kingsport, 2005.
- EDUARDO, L.H.P.R. *Efeitos da administração de vitamina A hidrossolúvel sobre as lesões e a disfunção hepática na colestase obstrutiva: estudo experimental em ratos jovens*. (Dissertação de Mestrado. Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição – Faculdade de Medicina de Botucatu), 2002.
- ELFERINK, R.O. Cholestasis. *Gut.*, v.52, p.42-8, 2003.
- ERLINGER, S. Pathophysiology of cholestasis. In: LENTZE, M., REICHEN, J. *Pediatric cholestasis – Novel Approaches to Treatment. Proceedings of the 63<sup>rd</sup> Falk Symposium*, Titisee/Black Forest, Alemanha: Kluwer Academic Publishers, . 1991, cap.5, p.48-54.
- FERANCHAK, A.P., et al. Comparison of indices of vitamin A status in children with chronic liver disease. *Hepatology.*, v.42, p.782-92, 2005.
- FLOREANI, A. et al. Plasma antioxidant levels in chronic cholestatic liver diseases. *Aliment. Pharmacol.*, v.14, p.353-8, 2000.
- FOX., M.R.S., BRIGGS, G.M. Salt mixtures for purified type diets III – Na improved salt mixtures for chicks. *J. Nutr.*, v.72, p.242-50, 1960.
- FRANCAVILLA, R. Hepatitis and cholestasis in infancy: clinical and nutritional aspects. *Acta. Paediatr Suppl.* V.91, p.101-4, 2003

- FREUND, H., et al. Infusion of branched chain enriched amino acid solution in patients with hepatic encephalopathy. *Annu. Surg.*, v.196, p.209-20, 1982.
- FREY, B., BRAEGGER, C.P., GHELFI, D. Neonatal cholestatic hepatitis from carbamazepine exposure during pregnancy and breast feeding. *Ann. Pharmacother.*, v.36, p.644-7, 2002
- FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.2247-50, 2000.
- FURST P. El papel de los antioxidantes en el soporte nutricional. *Lect. Nutr.*, v.4, 1997.
- FURUCHU, T., et al. Tissue specific distribution and metabolism of vitamin A are effected by dietary protein level in rats. *Inter. J. Vit. Nutr. Res.*, v.68, p.287-92, 1998.
- GARCIA-SUAREZ C., et al. Plasma leptin in patients with primary biliary cirrhosis and their relationship with degree of fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.*, v.27, p.47-50, 2004.
- GHEZZI, P., SACCARDO, B., BIANCHI, M. Recombinante tumor necrosis factor depresses cytochromer P450 dependent microsomal drug metabolism in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.136, p.316-321, 1986.
- GIANNINI, E., et al. Is there a role for multiple quantitative liver function tests? *Dig. Liver Dis.*, v.32, p.644, 2000.

- GILANI, A.H, JANBAZ, K.H. Studies on protective of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl<sub>4</sub>- induced hepatotoxicity. *Gen. Pharmacol.*, v.26, p.627-31, 1995.
- GOULET, O.J., et al.: Preoperative nutritional evaluation and support for liver transplantation in children. *Transplant. Proc.*, v.19, p.3249-55, 1987.
- GOUMA, D.J., et al. Changes in nutritional status associated with obstructive jaundice and biliary drainage in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.44, p.362-9, 1986.
- GREIM, H., et al. Mechanisms of cholestasis. Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation. *Gastroenterol.*, v.63, p.837-45, 1972.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, v.91, p.145-25, 1991.
- HEUBI, J.E., SOKOL, R.J., MCGRAW, C.A. Comparison of total serum lipids measured by two methods. *J.Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.10, p.468-72, 1990
- HOCHMAN, J.A., et al. Mucopolidosis II (I-cell disease) presenting as neonatal cholestasis. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v.24, p.603-4, 2001
- HOLT, R.I.G., et al. The effect of short stature, portal hypertension, and, cholestasis on growth hormone resistance in children with liver disease. *Clin. Endocrinol. Metabol.*, v.84, p.3277-82, 1999.

- HORIE, S., et al. Effectiveness of recombinant human serum albumin in the treatment of ascites in liver cirrhosis. *Gen. Pharmacol.*, v.31, p.811-5, 1998.
- JAESCHKE, H., et al. Mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, v.65 , p.166-76, 2002.
- JAKUS V., LOPUCHOVA, M. Role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in liver diseases. *Bratisl Lek Listy.*, v.10, p.548-59, 1999.
- JANSEN, P.L., MULLER, M. Genetic cholestasis: lesson from the molecular physiology of bile formation. *Can. J. Gastroenterol.*, v.14, p.233-8, 2000
- KARPEN, S.J. Update on the etiologies and management of neonatal cholestasis. *Clin. Perinatal.*, v.29, p.159-80, 2002.
- KATZ, S., PESCOVITZ O.H., FROSFELD J.L. Growth failure and decreased levels of insulin-like growth factor I in obstructive jaundice are reversed by bile diversion. *J. Pediatr. Surg.*, v.26, p.900-2, 1991.
- KAUFMAN, S.S. et al. Nutritional support for the infant with extrahepatic biliary atresia. *J. Pediatr.*, v.110, p.679-86, 1987
- KELLY, D.A. Nutritional and growth in patients with chronic liver disease. *Indian. J. Pediatr.*, v.62, p.533-44, 1995.
- KELLY, D.A. Posttransplant failure in children. *Liver Transpl. Surg.*, v.3, p.32-9, 1997.

- KERAAN, M., MEYERS, O.L. Increase serum immunoglobulin levels following portacaval shunt in the normal rat. *Gut*, v.15, p.468-72, 1974.
- KINNMAN, N., et al. Hepatic stellate cell proliferation is an early platelet-derived growth factor-mediated cellular event in rat cholestatic liver injury. *Lab. Invest.*, v.81, p.1709-16, 2002.
- KJELDAHL.: Official methods of analysis. 8 ed. Washington: *Association of official and agriculture chemists*, 1965.
- KLEIN, G.L et al. Hepatic osteodystrophy in chronic cholestasis: evidence for a multifactorial etiology. *Pediatr. Transplant.*, v.6, p.136-40, 2002.
- KOBASHI, H., et al. Nonsuppurative cholangitis in inducet in neonatally thymectomized mice: a possible animal model for primary cirrosis. *Hepatology.*, v.19, p.1424-30, 1994.
- KONGO, M., et al. An association between lipid peroxidation and alpha-naphthylisothiocyanate inducet liver injury in rats. *Toxicol.*, v.105, p.103-10, 1999.
- KOWDLEY, K, V., et al. Plasma vitamin K<sub>1</sub> level is decreased in primary biliary cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.*, v.92, p.2059-61, 1997.
- KRÄHENBÜHL, S., et al. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology*, v.22, p.607-12, 1995.
- LAJOLO, F.M., CAMPOS FRANÇA, M.H., ZUCAS, S.M. Importância da cor da ração no consumo da mesma por ratos (*Ratus norvegicus var albinus*). *Rev. Fac. Fram. Bioquim.*, v.7, p.95-103, 1969.

- LANSIPA, S.J., et al. Pathogenesis of steatorrhea in primary cirrhosis. *Hepatology.*, v.5, p.837-42, 1985
- LASCALA, G.C et al. The addition of lipids increases the total parenteral nutrition-associated cholestasis in the rat. *Eur. J. Pediatr. Surg. Aug*, v.3, p.224-227, 1993.
- LECHNER, A.J., VELASQUEZ, A. Cholestatic liver injury increases circulating TNF-alpha and IL-6 and mortality after Escherichia coli endotoxemia. *Am. J. Respir. Crit. Car. Méd.*, v.157, p.1550-8, 1998
- LEE, J., et al. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterol.*, v.121, p.1473-84, 2001.
- LIMA, L.A.M., THOMAZ, A.C.P. Lipídios em terapia nutricional pediátrica. *Rev. Bras. Nutr Clin.*, v.6, p.135-8, 2001
- LIU, Z.G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell. Res.*, v.15, p.24-7, 2005.
- LUCAS, E.A., et al. Effect of vitamin E on lipid parameters in ovariectomized rats. *J Med Food.* v. 9, p. 77-83, 2006.
- LUTZ, J., VAGNER, M. Recovery from pentobarbital-induced sleep after administration of perfluorinated substitutes. *Artif. Organs.*, v.8, p.41-3, 1984.
- MACHLIN, L. J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, v1, p.441-5, 1987.

- MAGER, D.R., et al. Prevalence of vitamin K deficiency in children with mild to moderate chronic liver disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.42 (1), p.71-6, 2006.
- MAGGIORE, G. et al. Nutritional status of children with chronic liver disease. In: OLM, E., KASPER, H. *Metabolism and nutrition in liver disease*. Lancaster: MTP Press, 1984.
- MANZANARES, L.M.J., MEDINA, B.E. Cholestasis em el recién nacido y lactante. Orientación diagnóstica. *An. Pediatr.*, v.58, p.162-7, 2003
- MATHEW, J., et al. Quantitative analysis of macrophages and perisinusoidal cells in primary biliary cirrhosis. *Histopathology*, v.25, p.65-70, 1994.
- MEDEIROS, M.V.M.J., FREITAS, L.A.R., ANDRADE, Z.A. Difference in hepatic pathology resulting from bile duct obstruction in young and old rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.21, p.75-83, 1988.
- MEIER-ABT, P.J. Cellular mechanisms of intrahepatic cholestasis. *Drugs*, v.40, suppl., p.84-97, 1990.
- MEZEI, E. Nutritional state in liver disease: assesment, incidence and mechanisms of malnutrition. In: HOLM, E., KASPER, H. *Metabolism and nutrition in liver disease*. Lancaster: MTP Press, 1984, p.5-17.
- MILLER, O. O laboratório e as técnicas de imagem no diagnóstico clínico. São Paulo; Atheneu, 2002, p. 9-239.
- MINHAJUDDIN M, BEG ZH, IQBAL J. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol.*, v.43, p. 747-53, 2005.

- MONTALO, M.M., BERNACCHI, A.S., CASTRO, L.A. Prevention of benznidazole-induced prolonging effect on the pentobarbital sleeping time of rats using different thiol containing compounds. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, v.108, p.39-49, 2001.
- MOBARHAN, R., et al. Evaluation of the relative dose response test for vitamin A nutriture in cirrhotics. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.34, p.2264-70, 1981.
- MORGAN, E.T., LI-MASTER, T., CHENG, P.Y. Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicol.*, v.27, p.181-182, 2002.
- MURIEL, P., MORENO, M.G. Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.94, p.99-104, 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington: National Academy Press, 1996.
- NEGHBAB, M., STACELY, N.H. Alpha-naphthylisothiocyanate-induced elevation of serum bile acids: lack of causative effect on bile acid transport. *Chem. Biol. Interact.* V.5, p.179-92, 1996.
- NELSON, D.R. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.369, p.1-10, 1999.
- NAGANO, I. et al. Hepatic mitochondrial changes in experimental obstructive jaundice complicated by biliary infection. *Hepatogastroenterol.*, v.41, p.432-7, 1994.

- NEWSOME, P.N., et al. Low serum retinol levels are associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Aliment. Farmacol.*, v14, p.1295-301, 2000.
- NG, D.L., BALISTRERI, W.F. Treatment options for chronic cholestasis in infancy and childhood. *Curr. Treat. Options. Gastroenterol.*, v.8, p.419-30, 2005.
- NICHOLSON, T.E, RENTON, K.W. The role of cytokines in the depression of CYP 1A activity using cultured astrocytes as an in vitro model of inflammation in the central nervous system. *Drug. Metab. Dispos.*, v.30, p.42-6, 2002.
- OH, S.H., et al. Salvia miltiorrhiza inhibits biliary obstruction-induced hepatocyte apoptosis by cytoplasmic sequestration of p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 182, p. 27-33, 2002.
- OHTA, Y. Alpha-Tocopherol protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity in rats less effectively than melatonin. *Chem. Biol. Interact.*, v.161, p.115-24, 2006.
- O'KEEFE, J.H., et al. Life-style change for coronary artery disease. *Postgrad. Med.*, v.99, p.89-106, 1996.
- ORTIZ, M.C. Vitamin E prevents renal dysfunction induced by experimental chronic bile duct ligation. *Kidney Int.*, v.64, p.950-61, 2003.
- OTTE, J.B. History of pediatric liver transplantation. Where are we coming from? Where do we stand? *Pediatr Transplant.*, v.6, p.378-87, 2002.

- PADILLO, J.F., et al. Anorexia and the effect of internal biliary drainage on food intake in patients with obstructive jaundice. *J. Am. Col. Surg.*, v.192, p.584-90, 2001.
- PAOLINI, M., et al. Bile acid structure and selective modulation of murine hepatic cytochrome P450 –linked enzymes. *Hepatology*, v.30, p.730-39, 1999.
- PARK, P.H., et al. Effect of tetrandrine on experimental hepatic fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, v.87, p.261-8, 2000.
- PASCHOALIN, M. A., SPADOTO, N. T. *Gramática: teoria e exercícios*. São Paulo: FTD, 1989. 416p.
- PASSONI, C.R.M. Efeito hepatoprotetor da suplementação de vitamina C na cirrose biliar secundária – Estudo experimental em ratos jovens. (Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição – Faculdade de Medicina de Botucatu), 2004.
- PAUSCH J., GATZEN, M. Treatment of cholestatic hepatic diseases : More than the substitution of fat soluble vitamins? *Internist (Berl)*, v.1 (nov), 2006.
- PENA, J.C. Renal and extra-renal mechanisms of sodium and water retention in cirrhosis. *Rev. Invest. Clin.*, v.47, p.63-79, 1995.
- PETERTOM, P.W. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis improves glutathione status but fails to reduce lipid peroxidation. *Redox Rep.*, v.11, p.117-23, 2006.

- PHILLIPS, J.R., et al. Fat-soluble vitamin levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.*, v.96, p.2745-50, 2001.
- PHILLIPS, M.J., POUCELE, S. ODA, M. Mechanisms of cholestasis. *Lab. Invest.* v.54, p.593–608, 1986.
- PINZANI, M., MILANI, S. Cholestasis and fibrosis. In: MANNES, M.P., BOYER, J.L., JANSES, P.L.M., REICHEN, J. (Eds). *Cholestatic liver disease*, Dordrecht: Kluwer, 1998. p.88-99.
- POUPON, R., CHAZOUILLERES, O., POUPON, R.E. Chronic cholestatic disease. *J. Hepatol.*, v.32, p.129-40, 2000.
- PRATT, S., KAPLAN, M.M. Laboratory test in disease of the liver. In: SHIFF, E., SORREL, M.F., MADDEY, W.C. *shiff's Diseases of the Liver*. 8<sup>th</sup>, Philadelphia:Lippincot Raven, 1998, p.205.
- PRINCE, M.I. Oral antioxidant supplementation for fatigue associated with primary biliary cirrhosis: results of a multicentre, randomized, placebo-controlled, cross-over trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.17, p.137-43, 2003.
- QUIRK, P. et al. Insulin-like growth factors I and II are reduced in plasma from growth retarded children with chronic liver disease. *Growth. Regul.*, v.4, p.35-8, 1994.
- RAJEBHADUR , M. Mechanistic study of solubility enhancement of nifedipine using vitamin E-TPGS or solutol HS-15. *Drug Deliv.*, v.13, p.201-6, 2006.

- RAMIREZ , R.O, SOKOL, R.J. Medical management of cholestasis. In: SUCHY, F. J. Liver disease in children. St. Louis: Mosby, 1994, p.356-88.
- RAMM, G.A., et al. Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia. *Am. J. Pathol.*, v.153, p.527-35,1998.
- REICHEN, J., SIMON, F.R. Cholestasis. In: ARIAS, I.M., BOYER, J.L. *The liver: biology and pathobiology*. 3.ed. New York: Raven Press, 1994. p.343-61.
- REICHEN, J., SIMON, F.R. Cholestasis. In: ARIAS, I.M.; et al. *The liver: biology and pathology*. 2. ed.; New York: Raven Press, 1988. p.1105-24.
- RODRÍGUEZ, G.P. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, v.11 (1), p.46-57, 1997.
- ROCKEY, D.C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin. Liver. Dis.*, v.21, p.337-49, 2001.
- SANTOS, A.L. *Efeitos de dietas com baixo teor de gordura e com gordura de coco sobre as alterações lipídicas de sobre a lesão hepática na cirrose biliar secundária – estudo experimental em ratos jovens*. (Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de concentração: Metabolismo e Nutrição – Faculdade de Medicina de Botucatu), 2005.
- SASTRE, J., et al. Mitochondrial function in liver disease. *Front. Biosci.*, v.12, p.1200-9, 2006.

- SCHASCHMIDT, B.F. Bile formation and cholestasis. In: ZAKIM, D., BOYER, T. *Hepatology: a textbook of liver disease*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990. p.303-40.
- SCHIFF, E.R., et al. Diseases of the liver. part III, In: SCHIFF'S. *The cholestatic disorders*, 8. ed, Philadelphia: Lippincott Raven, 1998. v.1, p.607-717.
- SCHIMPL, G., et al. The impact of hepatic xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activities on liver function in chronic cholestasis. *Pediatr. Surg. Int.*, v.16, p.297-301, 2000.
- SCHOLMERICH, J. et al. Tauroursodeoxicholate prevents tauroolithocholate-induced cholestasis and toxicity in rat liver. *J. Hepatol.*, v.10, p.280-3, 1990.
- SELLINGER, M., BOYER, J.L. Physiology of bile secretion and cholestasis. In: POPPER, H., Schaffner, F., (Eds.) *Progress in liver diseases*. Philadelphia: WH Saunders, 1990. p.237-59
- SHAH, H.A., SPIVAK, W. Colestase neonatal – Novas abordagens à avaliação diagnóstica e ao tratamento. *Clínicas Pediátricas da América do Norte.*, v.5, p.973-95, 1994.
- SHEPHERD, R.W. Nutritional support of the child with chronic liver disease. In: SUCHY, F.J. *Liver disease in children*. St.Louis: Mosby-year Book, Inc., 1994. Cap, 22, p.340-389.
- SHERLOCK, S. Cholestasis. In: *Diseases of the liver and biliary system*. 11. ed., Bostor Blackwell Scientific Publication, 1989 p.248-72.
- SHERLOCK, S., DOOLEY, J. Cholestasis. In: *Diseases of the liver and biliary system*. 11. ed., Bostor Blackwell Scientific Publication, 2002 p.26-9.

- SINGH S., SHACKLETON G., AH-SING E, CHAKRABORTY J., BAILLY M. E. Antioxidant defenses in the bile duct – ligated rat. *Gastroenterology*, v.103, p.1625–9, 1992.
- SITRIN, M.T., BENGGOA, J.M. Intestinal absorption of cholecalciferol and 25-hidroxicolecalciferol in chronic cholestatic liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.46, p.1011, 1987.
- SOCHA, E.P., et al. Treatment of cholestatic children with water-soluble vitamin E (alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate): effects on serum vitamin E, lipid peroxides, and polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v.24(2), p.189-93, 1997.
- SOKOL, R.J. Fat-soluble vitamins and their importance in patients with cholestatic liver disease. *Gastroenterol., Clin. North. Am.*, v.23, n.4, p.673-705, 1994.
- SOKOL, R.J., et al. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology.*, v.17, p.869-81, 1993.
- SOKOL, R.J., et al: Frequency and clinical progression of the vitamin E deficiency neurologic disorder in children with prolonged neonatal cholestasis. *Am. J. Dis. Child.*, v.139, p.1211-5, 1985.
- SOKOL, R.J., et. al. Mechanism causing Vitamin E deficiency during childhood cholestases. *Gastroenterology*, v.89, p.1172-9, 1983.
- SOKOL, R.J., et al. Treatment of vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis with oral d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol-1000 succinate. *Gastroenterology.*, v.93, p.975-85, 1987.

- STAMPFER, M.J., HENNEKENS, C.H., MANSON, J.E., COLDITZ, G.A., ROSNER, B., WILLETT, W.C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med.*, v.20, p.1444-9, 1993.
- STIEHL, A., BENZ, C., SAUER, P. Mechanism of hepatoprotective action of bile salts in liver disease. *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, v.28, p.195-209, 1999.
- STOLZ, A. Liver physiology and metabolic function. In: FELDMAN M., FRIEDMAN L.S., SLEISENGER, M.H. *Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. 7.ed. Philadelphia: Saunders, 2002. p.1393-401.
- TAJIRI, H., et al. Three cases with TT virus infection and idiopathic neonatal hepatitis. *Invervirology*, v.44 p.364-9, 2001.
- TAKAHASHI, T. The effects of tromboxane A2 synthetase inhibitor (OKY-046) on complete hepatic ischemia in rats with obstructive jaundice. *Surg. Today*, v.26, p.15-20, 1996.
- TAN, J.J. Low incidence of alpha 1-antitrypsin deficiency among Filipinos with neonatal cholestatis. *J. Pediatr. Child. Hild. Health.*, v.42, p.694-7, 2006.
- TANGOKU, A., et al. Use of a specific cholecystokinin receptor antagonist (L-364, 718) to determine the role of cholecystokinin on feeding and body weight in rats with obstructive jaundice. *J. Assoc. Acad. Minor. Phys.*, v.3, p.38-40, 1992.
- TANYEL, M.C., MANCANO, L. D. Neurologic findings in vitamin E deficiency. *Am. Fam. Physician.*, v.55, p.197-201, 1997.

- TAPPEL, A.L. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.*, v.20, p.493 – 510, 1968.
- TELLES JR. M., TANNURI, U. *Suporte nutricional em pediatria*. São Paulo: Atheneu, 1994, p.233-48.
- TERAN, J.C. Nutrition and liver disease. *Curr. Gastroenterol.*, v.4, p.335-40, 1999.
- TOMAR, B.S. Infantile cholestasis – advances in its understanding :new concepts. *Acta. Paediatr. Taiwan.*, v.41, p.6-12, 2000.
- TRABER, M.G., et al. Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in thoracic duct-cannulated rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.44, p.914–23, 1986.
- TRABER, M.G., et al. Efficacy of water-soluble vitamin E in the treatment of vitamin E malabsorption in short-bowel syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.59, p.1270–4, 1994.
- TRABER, M.G., et al. Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate  $\alpha$ -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J. Clin. Invest.*, v.85, p.397-407, 1990.
- UDEN, A.L., et al. IGF-I in a normal population :relation to psychosocial factors. *Clin. Endocrinol.*, v.57, p.793-803, 2002.
- VAJRO, P., et al. Cholestasis in newborn infants with perinatal asphyxia. *Acta Pediatr.* v.86, p.895-8, 1997.
- VAN PYVELCE, J., et al. The hepatoprotective principle of hypotesis triflora leaves. *J. Ethnopharmacol*, v.26, p.121-7, 1989.

- WALKOWIAK, J., et al. Normal pancreatic secretion in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Scand. J. Gastroenterol.* v.41, p.1480-3, 2006.
- WASSER, S., TAN, C.E. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat. *Ann. Acad. Med. Singapore.*, v.28, p.10-11, 1999.
- WATSON S., GIACOIA, G.P., Cholestasis in Infancy. A review. *Clin. Pediatr. (Phila).*, v.22, p.30-6, 1983.
- WELSH, F.K., et al. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann. Surg.*, v.227, p.205-12, 1998.
- WHITINGTON, P.F. Chronic cholestasis of infancy. *Pediatr. Clin. North Am.*, v.43, p.1-26, 1996.
- WU, J., et al. Glutamine attenuates TPN-associated liver injury in infant rabbits. *Eur. J. Pediatr.*, v. 14, 2006.
- YOON, P.W., et al. Epidemiology of Biliary Atresia: A Population-based Study. *Pediatrics*, v.99, p.376-382, 1997.
- YOUK, H.J., et al. Enhanced anticancer efficacy of alpha-tocopheryl succinate by conjugation with polyethylene glycol. *J Control Release*, v.107, p.43-52, 2005.
- ZAHAVI, I., et al. The effect of cisapride on total parenteral nutrition-associated cholestasis in rats. *Isr. Med. Assoc. J.*, v.2, p.91-3, 2000.
- ZIMMERMAN H. J. Intrahepatic Cholestasis. *Arch Intern Med.*, v.139, p.1038-45, 1979.

Anexos

**Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA

**Comissão de Ética na Experimentação Animal**

BOTUCATU, SP - RUIBÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - PABX (014) 820-6143 - FAX (014) 821-2202

## CERTIFICADO

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 147 sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito hepatoprotetor da vitamina E-TPGS em ratos jovens com colestase obstrutiva", sob a responsabilidade de Adriane Gasparino dos Santos, com a colaboração dos Professores Claudio Antonio Rabello Coelho, Kunie Iabuki Rabello Coelho e Carlos Antonio Caramori, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional, sem condições de emitir atestado de Sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em 25 de setembro de 2.000

Botucatu, em 25 de setembro de 2.000

  
Prof. Dr. Antero Frederico M. Miranda  
Presidente

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA

*Seção de Pós-Graduação*

---

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18.618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022

---

### JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa “**Efeito Hepatoprotetor da Vitamina E-TPGS em Ratos Jovens com Colestase Obstrutiva**”, aprovado pelo CEP em 25/09/2000, teve seu título alterado para “**Efeito da Vitamina E-TTPGS Hidromiscível Sobre as Alterações Nutricionais e a Lesão Hepática na Colestase Crônica- Estudo Experimental em Ratos Jovens**”, sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Tese de Doutorado.

**Botucatu, 22/01/2007**

Adriane Gasparino dos Santos

Doutor Cláudio A. R. Coelho

*Programa de Pós Graduação em Pediatria.*